

LC-MS/MS-Analyse von Eicosanoiden

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

von
Ronald Schmidt
aus Arad/Rumänien

Frankfurt am Main 2006
(D30)

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Dieter Steinhilber
Prof. Dr. Dr. Gerd Geißlinger
.....

Datum der Disputation:

*„Nicht das Hinfallen ist schlimm,
sondern es ist schlimm, wenn man dort liegen bleibt, wo man hingefallen ist.“*

Sokrates

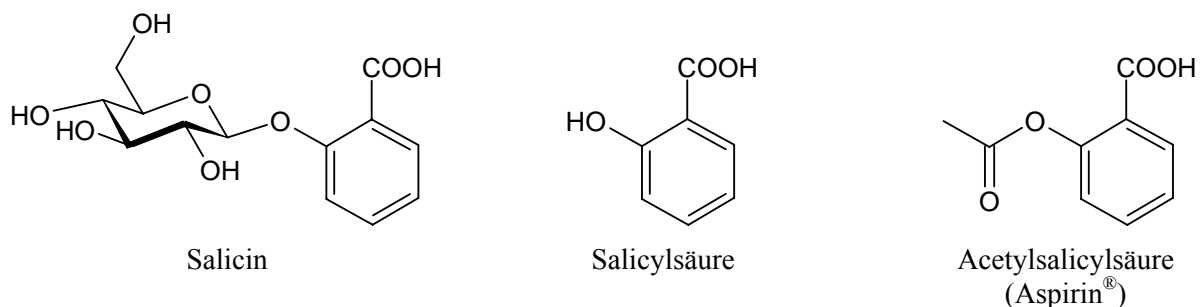
1.	<i>Einleitung</i>	1
1.1	Eicosanoide	3
1.1.1	Einleitung	3
1.1.2	Biosynthese von Eicosanoiden durch Cyclooxygenasen.....	4
1.1.3	Prostaglandin E ₂	7
1.1.4	Prostaglandin D ₂	8
1.1.5	Prostaglandin F _{2α}	8
1.1.6	Prostacyclin, PGI ₂	9
1.1.7	Thromboxan A ₂	9
1.2	Schmerzwahrnehmung	10
1.2.1	Nozizeption	10
1.2.2	Molekulare Grundlagen der Nozizeption im Rückenmark.....	10
1.3	Ziel der Arbeit	14
2.	<i>Theoretische Grundlagen zur Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie</i>	15
2.1	Einleitung	15
2.1.1	LC-MS-Kopplung	16
2.1.2	Elektrospray-Ionisation (ESI)	16
2.1.3	Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)	20
2.2	Methodenvalidierung	24
2.2.1	Selektivität	24
2.2.2	Richtigkeit und Konzentrationsbereich	25
2.2.3	Präzision.....	25
2.2.4	Sensitivität.....	25
2.2.5	Wiederfindung.....	26
2.2.6	Matrixeffekte.....	26
2.2.7	Stabilität	27
3.	<i>Bestimmung von Prostaglandin E₂ und D₂ aus Mikrodialysaten von Ratten</i>	29
3.1	Zielsetzung	29
3.2	Methodenentwicklung	30
3.2.1	Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen	30
3.2.2	Optimierung der chromatographischen Bedingungen.....	35
3.2.3	Optimierung der Aufarbeitung	39
3.2.4	Vorversuche	41
3.2.5	Ergebnisse der Optimierung.....	44
3.3	Methodenvalidierung	47
3.3.1	Richtigkeit.....	47
3.3.2	Selektivität und Spezifität	48
3.3.3	Präzision.....	49
3.3.4	Wiederfindung.....	50
3.3.5	Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte.....	51
3.3.6	Stabilität	51
3.3.7	Ergebnisse der Methodenvalidierung	54
3.4	Mikrodialysestudie	56
3.4.1	Durchführung	56
3.4.2	Ergebnisse	57

3.5	Diskussion und Zusammenfassung	59
4.	<i>mPGES-1-Aktivitäts-Assay</i>	61
4.1	Zielsetzung	61
4.2	Methodenentwicklung.....	61
4.2.1	Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen	61
4.2.2	Optimierung der chromatographischen Bedingungen.....	62
4.2.3	Optimierung der Aufarbeitung	64
4.2.4	Vorversuche	64
4.2.5	Ergebnisse der Optimierung.....	67
4.3	Methodenvalidierung	72
4.3.1	Richtigkeit.....	72
4.3.2	Selektivität und Spezifität	73
4.3.3	Präzision.....	75
4.3.4	Wiederfindung.....	76
4.3.5	Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte.....	77
4.3.6	Stabilität	78
4.3.7	Ergebnisse der Methodenvalidierung.....	81
4.4	<i>mPGES-1-Aktivitäts-Assay mit Celecoxib, Rofecoxib, Paracetamol, MK-886, R- und S-Flurbiprofen</i>.....	83
4.4.1	Reagenzien	83
4.4.2	Durchführung	83
4.4.3	Ergebnisse	84
4.5	Diskussion und Zusammenfassung	88
5.	<i>Bestimmung von Prostaglandinen und Thromboxan B₂ aus Humanplasma nach LPS-Stimulation</i>	90
5.1	Zielsetzung	90
5.2	Methodenentwicklung.....	90
5.2.1	Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen	90
5.2.2	Optimierung der chromatographischen Bedingungen.....	90
5.2.3	Optimierung der Aufarbeitung	91
5.2.4	Vorversuche	93
5.2.5	Ergebnisse der Optimierung.....	97
5.3	Methodenvalidierung	101
5.3.1	Richtigkeit.....	101
5.3.2	Selektivität und Spezifität	104
5.3.3	Präzision.....	105
5.3.4	Wiederfindung.....	106
5.3.5	Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte.....	108
5.3.6	Stabilität	109
5.3.7	Ergebnisse der Methodenvalidierung.....	111
5.4	Studien.....	113
5.4.1	LPS-Stimulation von Humanplasmen in Mutanten des COX-2-Promotors.....	113
5.4.2	Vergleich von Immunoassay und LC-MS/MS	116
5.5	Diskussion und Zusammenfassung	118

6.	<i>Zusammenfassung</i>	120
7.	<i>Material</i>	122
7.1	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	122
7.1.1	Künstlicher Liquor (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)	124
7.1.2	mPGES-1-Assay-Lösung	124
7.1.3	0,15 M EDTA.....	125
7.1.4	45 mM Phosphorsäure.....	125
7.2	<i>Materialien</i>	125
7.3	<i>Geräte</i>	125
7.4	<i>Software</i>	126
8.	<i>Literatur</i>	127
9.	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	134
10.	<i>Veröffentlichungen</i>	138
10.1	<i>Veröffentlichungen aus der vorliegenden Arbeit</i>	138
10.2	<i>Sonstige Veröffentlichungen</i>	138
11.	<i>Förderung und Danksagung</i>	140
12.	<i>Lebenslauf</i>	141
13.	<i>Anhang I – Massenspektren am API 3000</i>	142
14.	<i>Anhang II – Massenspektren am API 4000</i>	152

1. Einleitung

Bereits zu Zeiten der Ägypter war die analgetische und antipyretische Wirkung des Weidenrindentees bekannt. Doch erst Anfang des 19. Jahrhunderts wurde der Hauptbestandteil der Weidenrinde, das Salicin (Formel 1-1), extrahiert und als eigenständiges Produkt vertrieben. Aufgrund seines bitteren Geschmacks, der schlechten Verträglichkeit und des verhältnismäßig hohen Preises wurde weiterhin nach Alternativen gesucht. Durch Hydrolyse des Salicins konnte Salicylsäure (Formel 1-1) als die eigentliche Wirksubstanz der Weidenrinde identifiziert werden. Nachdem die Struktur der Salicylsäure aufgeklärt und eine Synthese von Kolb 1874 erarbeitet wurde, konnte die Substanz durch seinen niedrigen Preis den Salicinextrakt fast vollständig vom Markt verdrängen. Auf der Suche nach noch wirksameren, verträglicheren und vor allem besser schmeckenden Substanzen synthetisierte der Chemiker Felix Hoffmann 1895 ein Analogon der Salicylsäure, die Acetylsalicylsäure [6]. Obwohl die Acetylsalicylsäure (Aspirin®) in den folgenden Jahren zum weltweit erfolgreichsten Schmerzmittel aufstieg, konnte ihr Wirkprinzip bis 1971 nicht aufgeklärt werden. Erst Vane und Ferreira wiesen mit ihren Arbeiten nach, dass Acetylsalicylsäure und analoge Substanzen über die Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese analgetisch, antipyretisch und antiinflammatorisch wirken [7-9].



Formel 1-1: Strukturformeln des Salicins, der Salicylsäure und der Acetylsalicylsäure.

1930 entdeckte Kurzrock und Lieb [10], dass Samenflüssigkeit sowohl relaxierend als auch kontrahierend auf den Uterus wirken kann. Goldblatt und von Euler berichteten ähnliche Effekte [11-14]. Doch erst von Euler erkannte, dass ungesättigte Fettsäuren die verschiedenen Wirkungen verursachen. Er nannte diese Fettsäuren Prostaglandine [15], weil er davon überzeugt war, dass sie in der Prostata gebildet werden. Einige Jahre später erkannte von Euler selbst, dass die Prostaglandine nicht aus der Prostata, sondern aus der Blase stammen, aber eine Umbenennung war zu diesem Zeitpunkt nicht mehr möglich. Aufgrund der fehlenden technischen Voraussetzungen in den 30er Jahren konnten erst Bergström und Samuelsson 1963 ihre Struktur aufklären [16] und zeigen, dass sämtliche Prostaglandine von einer essentiellen C₂₀-Fettsäure, der Arachidonsäure (all-cis- $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eicosatetraensäure bzw. 20:4 ω -6), abstammen [17]. Prostaglandine sind parakrin wirkende Lipid-Mediatoren, welche von bestimmten Zellen freigesetzt werden können. Neben vielfältigen physiologischen Wirkungen, die meist lokal begrenzt und stark vom Zell-

bzw. Gewebetyp abhängig sind, vermitteln Prostaglandine vor allem Schmerz, Fieber- und Entzündungsreaktionen.

Prostaglandine sind aber nicht die einzigen Substanzen, die aus Arachidonsäure entstehen können. Neben Prostaglandinen (PG) werden aus der Arachidonsäure viele andere Fettsäureprodukte, wie z.B. Leukotriene (LT), Epoxyeicosatriensäuren (EET), Isoprostane (IP), Endocannabinoide, Hepoxiline (HX) und Lipoxine (LX) mit unterschiedlichsten physiologischen und pathophysiologischen Wirkungen gebildet. Sie alle werden unter dem Begriff Eicosanoide zusammengefasst und sind aufgrund ihrer Struktur- und Wirkungsvielfalt so interessant für die Wissenschaft geworden. Für ihre Arbeiten auf dem Gebiet der Prostaglandine erhielten Vane, Bergström und Samuelsson 1982 den Nobelpreis für Medizin.

Um physiologische und pathophysiologische Funktionen der Eicosanoide zu erforschen, aber auch um die Wirkung neuer Arzneistoffe auf den Eicosanoidstoffwechsel zu untersuchen, ist eine Eicosanoidanalytik unentbehrlich. Zur Bestimmung werden zurzeit zwei unterschiedliche Verfahren eingesetzt. Zum einen sind dies die auf Antikörper basierenden ELISA- und RIA-Assays und zum anderen die chromatographischen Methoden HPLC (Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie), GC (Gaschromatographie) und CE (Kapillarelektrophorese). ELISA-Assays besitzen zwar eine hohe Sensitivität, aber durch die Strukturähnlichkeit verschiedener Eicosanoide zeigen sie Kreuzreaktionen und können so zu falschen Ergebnissen führen. Durch chromatographische Trennung mittels HPLC, GC und CE kann das Problem der Kreuzreaktionen zwar vermindert werden, allerdings ist die Empfindlichkeit der üblichen Ultraviolett-, Fluoreszenz- oder Verbrennungsdetektoren für die Eicosanoidanalytik oft nicht ausreichend und erst die Kopplung mit Massenspektrometern als Detektoren ermöglichte die Entwicklung von sensitiveren Methoden.

Da alle Eicosanoide für die Analyse mit Gaschromatographie nicht ausreichend flüchtig sind, müssen diese derivatisiert werden, was automatisch Probleme in der Methodenentwicklung mit sich bringt. Um diesen Nachteil der Gaschromatographie zu umgehen, wurde die Kopplung der HPLC mit Massenspektrometern erheblich verbessert. Durch die Entwicklung von neuen Ionisierungsverfahren und durch den Einsatz von Tandem-Massenspektrometern (MS/MS), konnte die Sensitivität und Selektivität gesteigert und zusätzlich die Analysenzeit erheblich reduziert werden.

Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) ist aufgrund der hohen Selektivität, Sensitivität und des hohen Probendurchsatzes aus modernen Laboratorien für Pharmakologie, Forensik, Doping- und Rückstandsanalytik nicht mehr wegzudenken und stellt damit eine geeignete analytische Methode dar, um geringe Mengen an Eicosanoiden in biologischen Flüssigkeiten und Geweben nachzuweisen und zu quantifizieren.

1.1 Eicosanoide

1.1.1 Einleitung

Als Quelle der Eicosanoide dienen hauptsächlich die mehrfach ungesättigten C₂₀-Fettsäuren Dihomo- γ -linolensäure (DGLA), Arachidonsäure (AA) und Eicosapentaensäure (EPA) (Abbildung 1-1) [18].

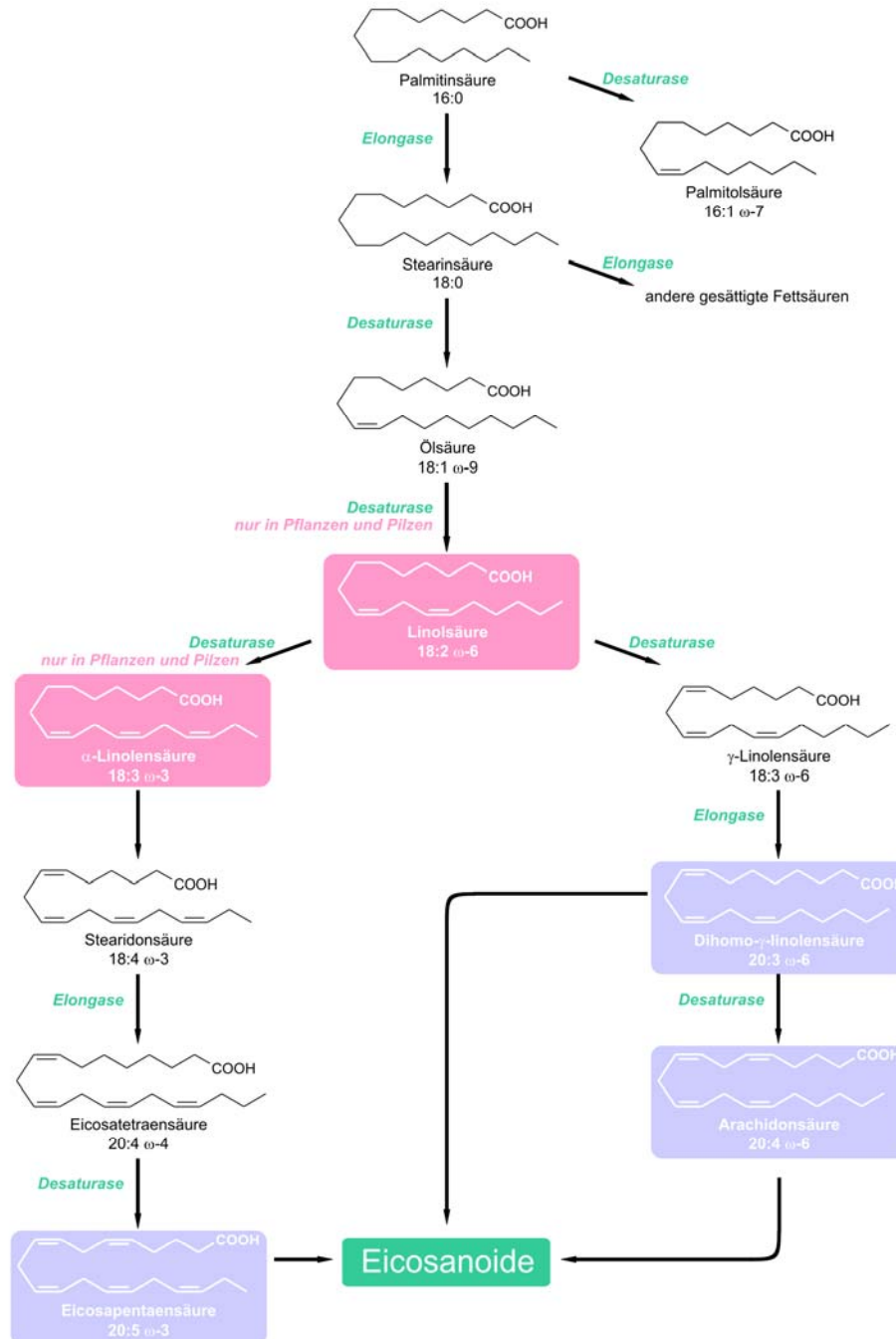


Abbildung 1-1: PUFA-Pathway (engl. *polyunsaturated fatty acids*, mehrfach ungesättigte Fettsäuren). Linolsäure und α -Linolensäure sind essentiellen Fettsäuren (rot markiert).

Sie werden entweder über die Nahrung aufgenommen oder aus kürzeren Fettsäuren synthetisiert. Mit Hilfe von Elongasen und Acetyl-CoA wird das Carboxylende einer Fettsäure um 2 Kohlenstoffatome verlängert und mit Δ^n -Desaturasen *cis*-Doppelbindungen an Kohlenstoff C_n eingeführt. Tierische Zellen besitzen keine Δ^{12} -Desaturase, so dass Linolsäure und α -Linolensäure für den Menschen essentielle Fettsäuren sind und mit der Nahrung aufgenommen werden müssen. Nach der Synthese oder Resorption der Fettsäuren werden diese durch Coenzym-A-abhängige Synthasen und Lysophospholipid-Acyltransferasen als Glycerophospholipide (Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylethanolamin oder Phosphatidylinositol) in die Zellmembranen eingebaut, so dass die freie Konzentration der Fettsäuren im Zytoplasma sehr gering ist [19-21].

Charakteristisches Strukturmerkmal von Dihomo- γ -linolensäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure ist ihre reaktive 1,4-*cis,cis*-Pentadien-Struktur, die durch Sauerstoffkontakt oder durch verschiedene Enzymsysteme zu zahlreichen Peroxy-, Hydroxy- und Epoxy-Derivaten oxidiert werden kann. Abhängig von der Enzymsausstattung der Zelle können so Prostaglandine (PG), Thromboxan (TX), Leukotriene (LT), Epoxyeicosatriensäuren (EET), Lipoxine (LX), Hepoxiline (HX), Isoprostane (IP) und Endocannabinoide entstehen (Abbildung 1-2). Obwohl neben Arachidonsäure auch Dihomo- γ -linolensäure und Eicosapentaensäure direkte Vorstufen der Eicosanoide sind, spielen sie aufgrund ihrer geringen physiologischen Konzentration nur eine untergeordnete Rolle, weshalb auf sie nicht näher eingegangen wird.

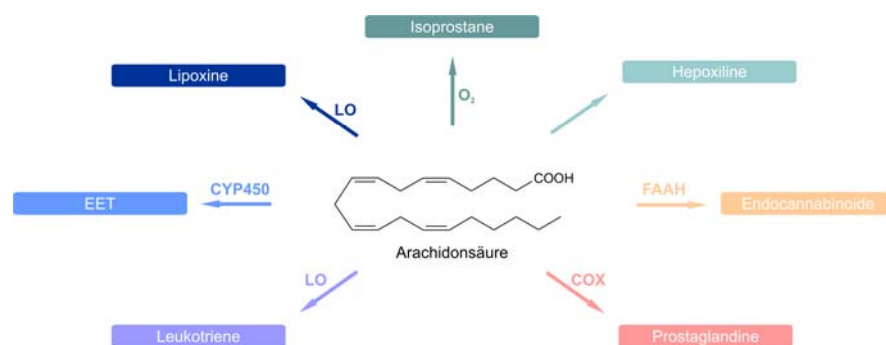


Abbildung 1-2: Eicosanoid-Stoffwechselweg. Arachidonsäure wird durch die verschiedenen Enzymsysteme der Zelle zu unterschiedlichsten Substanzklassen umgewandelt. Abkürzungen: COX = Cyclooxygenase; LO = Lipoxygenase; CYP450 = Cytochrom-P450-Isoenzyme; FAAH = Fettsäure-Amid-Hydrolase (engl. *fatty acid amide hydrolase*).

1.1.2 Biosynthese von Eicosanoiden durch Cyclooxygenasen

Innerhalb des Glycerophospholipids belegt die Arachidonsäure meistens die sn-2-Position des Glycerols, die sn-1-Position nehmen verschiedene andere Fettsäuren ein und die sn-3-Position ist durch eine polare Phosphogruppe besetzt. Werden Phospholipasen (PL) durch einen exogenen Stimulus aktiviert, z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Cytokine oder Wachstumsfaktoren, so spalten sie die Esterbindung an der sn-2-Position des Glycerols und setzen so Arachidonsäure unter Abspaltung von Lysophospholipid aus ihrem

Depot frei (Abbildung 1-3). Neben Phospholipase C (PLC) ist es hauptsächlich Phospholipase A₂ (PLA₂), die Arachidonsäure von membrangebundenen Glycerophospholipiden abspaltet.

Zur Zeit sind 19 Typen der PLA₂ bekannt, die sich in cytosolische (cPLA₂), sekretorische (sPLA₂, Ca²⁺-abhängig), inhibitorische (iPLA₂, Ca²⁺-unabhängig) und andere Phospholipasen einteilen lassen [22,23], doch nur cPLA₂ zeigt eine gewisse Selektivität für Arachidonsäure.

Die freie Arachidonsäure wird anschließend durch die bifunktionale Cyclooxygenase (COX) – auch PGH-Synthase (PGHS) genannt – in ein labiles 15-Hydroperoxyendoperoxid (PGG₂) oxidiert, wobei der charakteristische Cyclopentanring der Prostaglandine entsteht. Ein zweites katalytisches Zentrum der COX, die Peroxidase, reduziert anschließend das reaktive Endoperoxid zum PGH₂, welches durch verschiedene Synthesen in die Prostaglandine PGI₂, PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂ und Thromboxan A₂ (TXA₂) überführt wird. Allerdings ist die Halbwertszeit von PGI₂ und von TXA₂ in physiologischer Umgebung so gering (wenige Minuten), dass nur deren Metabolite 6-keto-PGF_{1α} bzw. TXB₂ nachweisbar sind.

Zur Zeit sind nur die zwei COX-Isoformen COX-1 und COX-2 bekannt, die durch zwei verschiedene Gene codiert werden [24]. Zusätzlich zu diesen gut charakterisierten Isoformen wurden mehrere Splicevarianten von COX-1- und COX-2 in verschiedenen Geweben detektiert [25]. Während die physiologische Bedeutung der meisten COX-Splicevarianten derzeit unbekannt ist, wurde in Hunden eine katalytisch aktive COX-1-Variante entdeckt, die durch Paracetamol gehemmt wird [26]. Genetische Untersuchungen zeigten jedoch, dass diese Variante beim Menschen ein Protein mit nur geringer COX-Homologie und ohne COX-Aktivität darstellt [27]. Daher ist diese COX-1-Variante beim Menschen vermutlich nicht an der Prostaglandin-Biosynthese beteiligt. Obwohl beide Isoformen nur in ca. 60 % ihrer Proteinsequenz übereinstimmen, zeigen beide bei der Umsetzung von Arachidonsäure zu PGH₂ ähnliche kinetische Parameter. Doch trotz ähnlicher Kinetik unterscheiden sich beide Isoformen in der Tertiärstruktur ihres katalytischen Zentrums: Durch den Austausch von Isoleucin (Ile) gegen das kleinere Valin (Val) an den Positionen 434 und 523 wird die Bindungstasche der COX-2 gegenüber der COX-1 um 25 % größer [28-31]. Die größere Bindungstasche der COX-2 wurde bei der Entwicklung von selektiven COX-2-Inhibitoren (Celecoxib, Rofecoxib u.a.) ausgenutzt [32], weil sie aufgrund ihrer Größe und verwinkelten Struktur nicht an das katalytische Zentrum der COX-1 gelangen und diese somit nicht blockieren können.

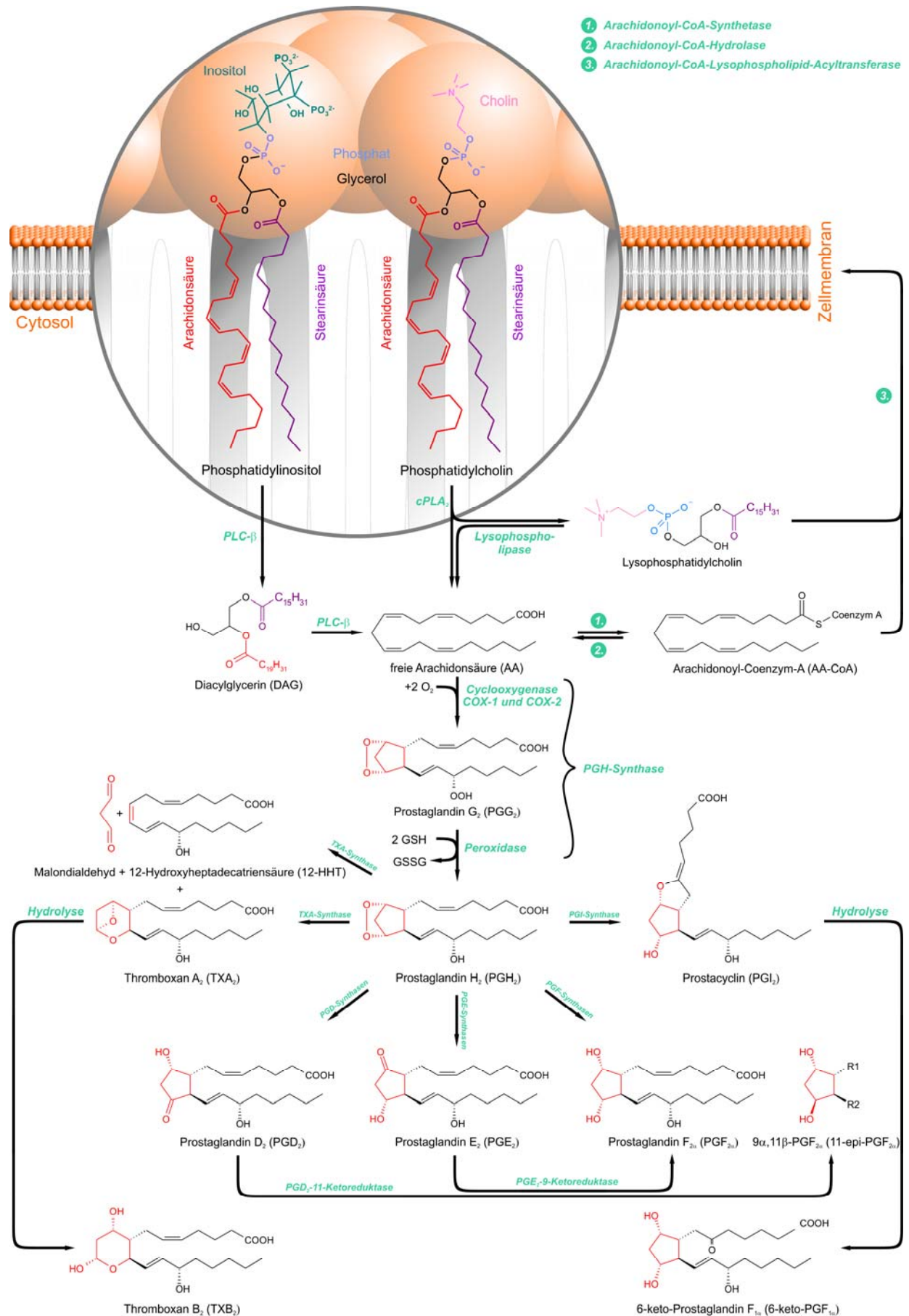


Abbildung 1-3: Biosynthese der Prostaglandine und Thromboxane aus Arachidonsäure.

COX-1 wird im Gegensatz zur COX-2 in fast allen Geweben konstitutiv exprimiert und vermittelt vor allem physiologische Funktionen, wie z.B. Zytoprotektion des Magens, Kontrolle des renalen Blutflusses und Plättchenaggregation der Thrombozyten. Da COX-2 bei akuten und chronischen Entzündungen, verschiedenen Krebsformen und Alzheimer hochreguliert wird, ging man lange Zeit davon aus, dass COX-2-Inhibitoren bedeutend weniger Nebenwirkungen verursachen als die unselektiven COX-Inhibitoren, wie z.B. Acetylsalicylsäure, die zusätzlich die COX-1 und damit auch physiologische Funktionen blockieren. Diese Annahme für selektive COX-2-Inhibitoren gilt heute als überholt, da auch die COX-2 im ZNS, in den Reproduktionsgeweben, in der Niere und in den Blutgefäßen konstitutiv exprimiert wird [33-36]. Zum anderen spielt die COX-2 eine wichtige Rolle in der Wundheilung, wodurch die Abheilung von Ulcera bei Einnahme von COX-2-Inhibitoren verzögert wird [37]. COX-2-Inhibitoren sind zwar besser verträglich als nicht selektive COX-Inhibitoren, aber doch nicht frei von Nebenwirkungen.

1.1.3 Prostaglandin E_2

Zur Zeit sind drei Synthasen bekannt, die die Umwandlung von PGH_2 in PGE_2 katalysieren: Membran-gebundene PGE-Synthase-1 (mPGES-1) [38], Membran-gebundene PGE-Synthase-2 (mPGES-2) [39] und cytosolische PGE-Synthase (cPGES) [40]. mPGES-1 ist funktionell an COX-2 gekoppelt und kann genauso wie COX-2 durch proinflammatorische Stimuli ($\text{IL-1}\beta$) hochreguliert werden [41-43]. mPGES-2 und cPGES sind dagegen funktionell an COX-1 gebunden und werden wie diese konstitutiv exprimiert [40]. Diese Regel ist jedoch nicht fest, denn mPGES-2 kann auch zusammen mit COX-2 vorkommen [39]. Für die Aktivität von mPGES-1 und cPGES, die zur Familie der Glutathion-S-Transferasen (GST) gehören, ist Glutathion (GSH) zwingende Voraussetzung; mPGES-2 benötigt dagegen zwar kein GSH, seine Aktivität kann aber durch vorhandenes GSH erheblich gesteigert werden.

Es wird vermutet, dass physiologische PGE_2 -Funktionen vorwiegend durch cPGES/mPGES-2/COX-1 und pathophysiologische PGE_2 -Funktionen durch das mPGES-1/COX-2-System vermittelt werden [44,45]. Die Funktionen selbst werden von insgesamt vier verschiedenen PGE_2 -Rezeptoren an die Zellen weitergegeben: EP_1 , EP_2 , EP_3 und EP_4 [46]. Eine Aktivierung des EP_1 -Rezeptors führt zur Kontraktion glatter Muskelzellen in den Bronchien und dem Gastrointestinaltrakt, wobei wahrscheinlich G_q -Proteine an der Signaltransduktion beteiligt sind [47]. Es kommt zu einem Ca^{2+} -Einstrom und Aktivierung von PLC, PKC und p38 MAP-Kinase. EP_2 und EP_4 sind G_s -gekoppelte G-Proteine und verwenden cAMP als second messenger, wodurch die Phosphokinase A aktiviert und MAP-Kinasen blockiert werden. Eine Aktivierung des EP_2 -Rezeptors ruft eine Relaxation von glatten Muskelzellen der Bronchien, des Gastrointestinaltraktes und von Blutgefäßen hervor. Der EP_4 -Rezeptor vermittelt eine vermehrte Schleimsekretion des Magens und hält den Ductus arteriosus Botalli offen [48]. Der EP_3 -Rezeptor wurde ursprünglich als Konstriktor von glatten Muskelzellen identifiziert und wurde später auch in der Niere, im Uterus, in der Nebenniere und im Magen nachgewiesen [49]. Als einziger EP-Rezeptor existieren vom EP_3 -Rezeptor verschiedenen Splice-Varianten, die alle die Bildung von cAMP hemmen, jedoch ist unklar auf welche Weise. Generell ist ein G_i -gekoppeltes G-Protein bekannt, aber auch ein alternativer Weg über

ein G_s -gekoppeltes G-Protein, eine Ca^{2+} -Aktivierung oder über das kleine G-Protein Rho wird diskutiert [46,49]. Eine Aktivierung des EP_3 -Rezeptors führt zur Hemmung der Magensäureproduktion, einer verstärkten Uteruskontraktion in der Schwangerschaft und es kommt zu einer Hemmung der Lipolyse und Neurotransmitterfreisetzung [48]. Darüber hinaus ist der EP_3 -Rezeptor im Hypothalamus an der Fieber-Induktion beteiligt [50,51].

1.1.4 Prostaglandin D_2

Für die Synthese von PGD_2 sind bisher 2 Synthasen bekannt: Lipokalin-PGD-Synthase (L-PGDS) und die hämatopoietische PGD-Synthase (H-PGDS) [52], die miteinander nicht verwandt sind. L-PGDS wird vorrangig im ZNS, in der Zerebrospinalflüssigkeit und im Plasma exprimiert und ist dort an der Regulation des Schlafzyklus [53], an der Regulation der Körpertemperatur und an der Nozizeption [54] beteiligt. H-PGDS gehört zur GST-Familie und wurde im Cytosol von Immunzellen nachgewiesen.

PGD_2 führt über PGD_2 -Rezeptoren (DP) zu einem cAMP-Anstieg und blockiert so im Plasma, wie PGI_2 , die Thrombozytenaggregation, ruft eine Vasodilatation hervor und ist bei der Auslösung allergischer Reaktionen beteiligt. Ob dieser cAMP-Anstieg durch ein G_s - oder ein G_q -gekoppeltes G-Protein verursacht wird, ist unklar [46]. Auf T-Helfer-Zellen ist nicht der DP-Rezeptor, sondern der DP2- oder CRTH2-Rezeptor (engl. *chemoattractant receptorhomologous molecule expressed on T Helper type 2*) lokalisiert, der wohl G_i gekoppelt ist und Chemotaxe von T-Helfer-Zellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten induziert [55].

Im Gegensatz zu PGD_2 vermittelt sein Metabolit, $15d-PGJ_2$, seine antiinflammatorische Wirkung über $PPAR_\gamma$, wodurch die Expression proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie AP-1, STAT und NF- κB gehemmt wird [56].

1.1.5 Prostaglandin $F_{2\alpha}$

$PGF_{2\alpha}$ kann durch PGH_2 -9,11-Endoperoxid-Reduktase aus PGH_2 , durch PGE_2 -9-Ketoreduktase aus PGE_2 oder durch PGD_2 -11-Ketoreduktase aus PGD_2 entstehen [57]. Von der PGD_2 -11-Ketoreduktase wurden bisher 2 Isoenzyme isoliert und als PGFS-1 und PGFS-2 bezeichnet. PGFS-1 wurde in der Lunge, in Lymphozyten, in Neuronen und in Endothelzellen nachgewiesen, PGFS-2 bisher nur in der Leber. Von den vier möglichen Stereoisomeren des $PGF_{2\alpha}$ werden nur zwei physiologisch gebildet: PGH_2 -9,11-Endoperoxid-Reduktase und PGE_2 -9-Ketoreduktase synthetisieren das herkömmliche $PGF_{2\alpha}$ (9β -, 11β - $PGF_{2\alpha}$) und 9α -, 11β - $PGF_{2\alpha}$ (11-epi- $PGF_{2\alpha}$) wird nur von PGFS-1 und PGFS-2 gebildet. Beide Isomere kontrahieren glatte Muskelzellen, aber nur 9α -, 11β - $PGF_{2\alpha}$ hemmt die Plättchenaggregation und induziert die Urinausscheidung. Während der Geburt wird $PGF_{2\alpha}$ ausgeschüttet und vermittelt die Uteruskontraktionen und die Erschlaffung des Gebärmutterhalses über $PGF_{2\alpha}$ -Rezeptoren (FP), EP_1 und EP_3 . Die Signaltransduktion über FP-Rezeptoren ist unklar, jedoch werden wohl MAP- und andere Kinasen über G_q - und/oder G_i -gekoppelte G-Proteine aktiviert [46]. Zudem ist $PGF_{2\alpha}$ auch an der Nozizeption beteiligt [58].

1.1.6 Prostacyclin, PGI_2

Bisher ist nur eine einzige Synthese für Prostacyclin bekannt. Die PGI-Synthase (PGIS oder CYP8A1) gehört zwar zur Familie der Cytochrom-P450-Isoenzyme, allerdings führt sie nicht, wie sonst bei Cytochromen üblich, Sauerstoff in PGH_2 ein, sondern bricht die Sauerstoffbrücke in PGH_2 . Dazu benötigt sie ein Häm-Molekül. PGIS wird hauptsächlich in den Endothelzellen der Blutgefäße, dem Herz, der Lunge, der Niere und in den Ovarien exprimiert. Zudem findet man PGIS noch im ZNS, im Pankreas, in der Prostata, in der Plazenta, der Milz und in Leukozyten [59].

PGI_2 blockiert die durch TXA_2 -vermittelte Thrombozytenaggregation und induziert eine Vasodilatation über Prostacyclin-Rezeptoren (IP) und Apoptose über PPAR_δ [60,61]. Für den Transduktionsmechanismus über IP-Rezeptoren kommen sowohl G_s -, G_q - als auch G_i -gekoppelte G-Proteine in Frage [46,62]. In der Niere reguliert PGI_2 den renalen Blutfluss, die glomeruläre Filtrationsrate und die Renin-Sekretion [62]. PGI_2 ist allerdings chemisch instabil und hydrolysiert in Plasma und Puffern (pH 7,4) mit einer Halbwertszeit von ~ 3 min in 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ [63,64].

1.1.7 Thromboxan A_2

Genauso wie PGIS gehört Thromboxan A-Synthase (TXAS) ebenfalls zu den Cytochrom-P450-Isoenzymen und ist mit CYP3A4 und CYP3A7 verwandt [65]. Interessanterweise katalysiert TXAS nicht nur die Synthese von PGH_2 zu Thromboxan A_2 , sondern auch den Zerfall von PGH_2 zu 12-HHT und Maledialdehyd [66,67] (Abbildung 1-3). Während dieser Synthese werden TXA_2 und 12-HHT im Verhältnis 1:1 gebildet, allerdings ist der Mechanismus zu dieser Reaktion noch nicht geklärt [68]. TXA_2 ist in physiologischer Umgebung instabil und wandelt sich mit einer Halbwertszeit von 30 Sekunden in TXB_2 um [69-71].

TXA_2 vermittelt die Plättchenaggregation und die Kontraktion glatter Muskelzellen in den Blutgefäßen und den Bronchien über den TXA_2 -Rezeptor (TP), von dem 2 Splicevarianten TP_α und TP_β existieren. Beide Varianten aktivieren wie der EP_1 -Rezeptor G_q -gekoppelte G-Proteine und damit PLC, PKC und p38 MAP-Kinase. Die Aktivierung von p38 MAP-Kinase über TP_α scheint für die Thrombozytenaggregation verantwortlich zu sein [72,73].

1.2 Schmerzwahrnehmung

1.2.1 Nozizeption

Unter dem Begriff Schmerz versteht man eine Sinnes- oder Gefühlswahrnehmung, die als Warnsystem den Organismus vor Schäden schützt. Während für die Schmerzwahrnehmung das Bewusstsein zwingende Voraussetzung ist, läuft die Aufnahme und Weiterleitung noxischer Reize, die Nozizeption, auch unbewußt ab. Die Aufnahme noxischer Reize erfolgt an Nozizeptoren, die aus „freien Nervenendigungen“ langsam leitender Afferenzen mit dünn myelinisierten A δ - und unmyelinisierten C-Fasern gebildet werden. Sie reagieren je nach Typ auf mechanische, chemische und thermische Stimuli (physiologischer Nozizeptorschmerz). Die meisten marklosen Nozizeptoren können auch von allen drei Stimuli erregt werden und werden dann als polymodal bezeichnet [3]. Überwindet der Reiz eine definierte Schwelle, so wird er in Aktionspotentiale transformiert, wobei die Frequenz aufeinander folgender Potentiale die Reizstärke wieder spiegelt. Anschließend werden die Aktionspotentiale über afferente Nervenfasern im Hinterhorn des Rückenmarks (Lamina I und II) auf sekundäre Neurone umgeschaltet und über die spinothalamischen Bahnen in das Gehirn weitergeleitet (Abbildung 1-4).

Über den Thalamus werden die Nervenfasern zu den primären und sekundären somatosensorischen Feldern der Großhirnrinde projiziert, wo der Schmerzreiz einer Körperregion zugeordnet wird. Eine weitere Verknüpfung führt zum limbischen System, wo der Schmerz eine emotionale Komponente erhält, und zum Hypothalamus, der vegetative Schmerzreaktionen steuert. Parallel zum Tractus spinothalamicus, der das aufsteigende schmerzvermittelnde System repräsentiert, existiert ein absteigendes schmerzhemmendes System, durch das die Intensität des Nozizeptorschmerzes kontrolliert wird. Aktivatoren dieses Systems sind Endorphine, Enkephaline und Opiate.

1.2.2 Molekulare Grundlagen der Nozizeption im Rückenmark

Glutamat spielt im Hinterhorn des Rückenmarks bei der synaptischen Übertragung von den primären afferenten auf sekundäre Neurone eine vorherrschende Rolle [4]. Nach seiner Freisetzung durch Aktionspotentiale bindet Glutamat an verschiedene postsynaptische ionotrope und metabotrope Rezeptoren (Abbildung 1-5). Zu den ionotropen Glutamatrezeptoren gehören der NMDA-, der AMPA- und der Kainat-Rezeptor.

Der NMDA-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter und spannungsabhängiger Ionenkanal, dessen Kanal im Ruhezustand durch Mg²⁺ blockiert wird und durch Glutamat alleine nicht aktiviert werden kann. Erst die Bindung von Glutamat an AMPA-, Kainat- oder metabotrope Glutamatrezeptoren oder die Bindung von Substanz P an Neurokinin-1-Rezeptoren (NK-1) führt zu einer leichten Depolarisation des Membranpotentials, wodurch Mg²⁺ aus dem Kanal des NMDA-Rezeptors verdrängt wird. Erst jetzt kann Glutamat auch den NMDA-Rezeptor aktivieren. Insgesamt kommt es durch Glutamat zu einer Depolarisation der Membran, einem Einstrom an Ca²⁺-Ionen, einer Aktivierung von PLA₂ und intrazellulären Signaltransduktionskaskaden (PKA, PKC, Ras, nNos) [74]. PLA₂ setzt daraufhin aus Membranen Arachidonsäure

frei, die von beiden Cyclooxygenasen und PGE-Synthasen zu PGE_2 umgewandelt wird. PGE_2 löst an präsynaptischen EP-Rezeptoren durch Stimulation von Ca^{2+} -Kanälen eine erneute Freisetzung von Neurotransmittern aus und führt damit zu einer Verstärkung des Schmerzsignals. Eine zusätzliche postsynaptische Verstärkung erfolgt durch PGE_2 über eine direkte Auslösung eines Membranpotentials und eine Hemmung von schmerzhemmenden Glycinrezeptoren [2,75].

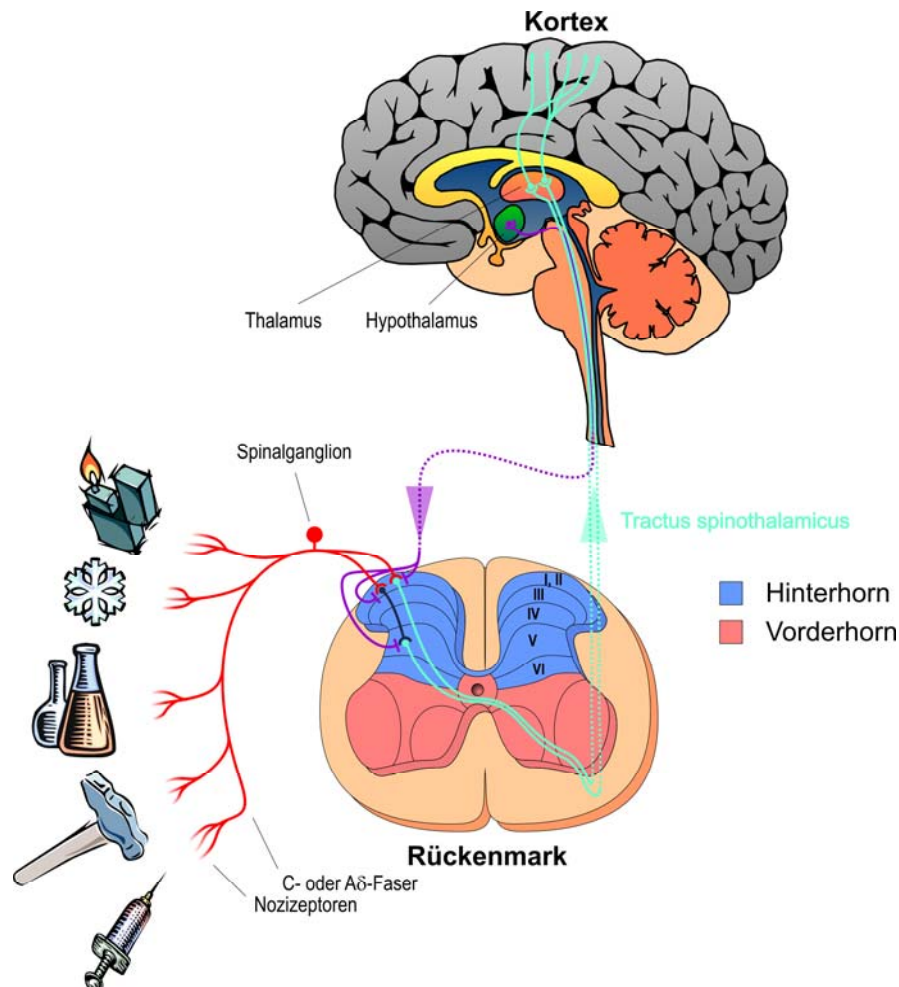


Abbildung 1-4: Vereinfachte Darstellung des physiologischen Nozizeptorschmerzes nach Scholz und Ladarola [5,76]. Nozizeptoren transformieren extreme Hitze, Kälte, Chemikalien oder mechanische Stimuli in Aktionspotentiale. Diese werden anschließend über C- oder A δ -Fasern (—) in das Hinterhorn geleitet und von dort über den Tractus spinothalamicus (.....) in die verschiedenen Zentren des ZNS geleitet. Das absteigende schmerzhemmende System (.....) hat seinen Ursprung im Hypothalamus und kann die Stärke des Schmerzes beeinflussen. Die verschiedenen Laminae des Hinterhorns sind mit römischen Ziffern beschriftet.

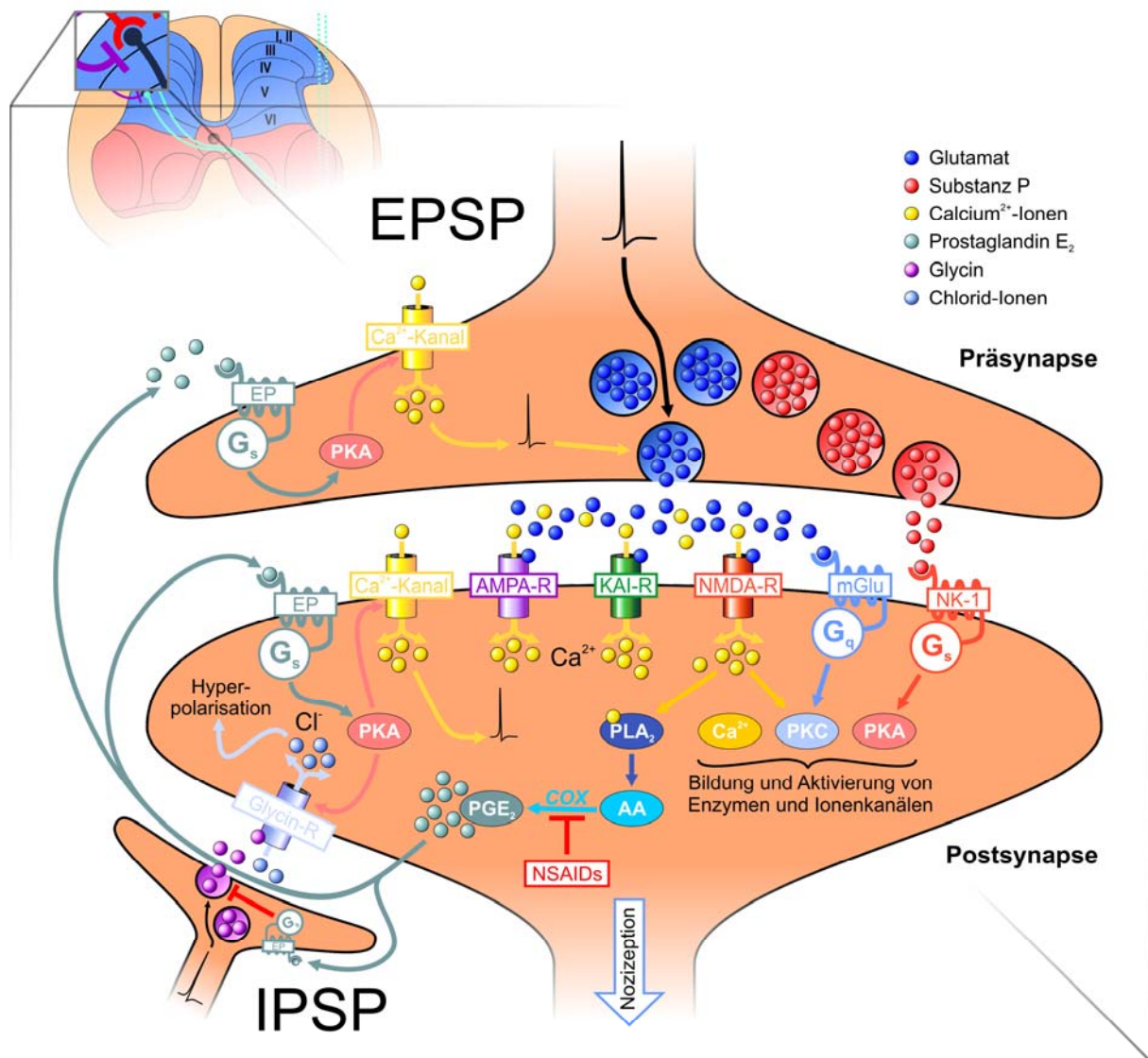


Abbildung 1-5: Vereinfachte Darstellung der synaptischen Übertragung im Hinterhorn nach Meßlinger, Scholz, Svensson und Woolf [2-5]. Glutamat und Substanz P übertragen das Aktionspotential von den primären afferenten auf sekundäre Neurone über verschiedene Rezeptoren. Abkürzungen: AMPA-R = α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor; KAI-R = Kainat-Rezeptoren; NMDA-R = *N*-Methyl-*D*-Aspartat-Rezeptoren; mGLU = metabotrope Glutamatrezeptoren; NK-1 = Neurokinin-1-Rezeptoren; EP = Prostaglandin E_2 -Rezeptoren; Glycin-R = Glycinrezeptoren; COX = Cyclooxygenase; AA, Arachidonsäure; PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; $\text{G}_{q/s}$ = G-Protein; EPSP = extrinsisches postsynaptisches Signal; IPSP = inhibitorisches postsynaptisches Signal.

Neben dem physiologischen Nozizeptorschmerz, der eine Warnfunktion besitzt, unterscheidet man einen pathophysiologischen Nozizeptorschmerz. Die Ursache solch pathologischer Schmerzen ist meist ein Trauma oder eine Entzündung [3,5,77]. In vielen Fällen ist die Schmerzschwelle so weit herabgesetzt, dass normalerweise nicht noxische Reize Schmerzen hervorrufen können (Allodynie), oder die Schmerz-

sensitivität ist auf eine Weise moduliert, dass der Organismus auf einen physiologischen Schmerz mit erhöhter Intensität antwortet (Hyperalgesie). Für die Hyperalgesie ist vermutlich das signalverstärkende PGE_2 hauptsächlich verantwortlich. Ursachen für diese Sensibilisierung des Nervensystems können komplexe Veränderungen der Genexpression am Nozizeptor, an der synaptischen Übertragung auf die Interneurone im Rückenmark oder an den Neuronen im Gehirn selbst sein [5,78-80], was als neuronale Plastizität bezeichnet wird. Je nach Art und Dauer des Schmerzes (physiologischer Nozizeptorschmerz, inflammatorischer Schmerz oder neuropathischer Schmerz) muss pharmakologisch unterschiedlich eingegriffen werden [81], um zu verhindern, dass der akute Schmerz chronisch wird. Bei den meisten Veränderungen, die zur Sensibilisierung des Nervensystems führen, sind Prostaglandine, vor allem PGE_2 , als pronozizeptive Substanzen beteiligt, wodurch die gute Wirksamkeit von NSAIDs erklärt werden kann. COX-Inhibitoren hemmen die Prostaglandin-Synthese sowohl in der Peripherie [7], im ZNS und im Rückenmark [82]. Im Gegensatz zur Peripherie, wo COX-2 normalerweise nur infolge von Entzündungsmediatoren wie $\text{IL-1}\beta$ oder TNF_α exprimiert wird, findet man im Rückenmark sowohl mRNA als auch das native Protein beider Cyclooxygenasen [83-85]. COX-2 kann hier ebenfalls durch verschiedene periphere Entzündungsmediatoren hochreguliert werden und mit der erhöhten COX-2-Expression geht auch ein Anstieg von PGE_2 in der Zerebrospinalflüssigkeit einher. Der PGE_2 -Anstieg infolge einer peripheren Entzündung oder auch durch akute noxische Reize, wie z.B. die Injektion von Formalin in die Hinterpfote einer Ratte (Formalin-Test), kann durch COX-2-Inhibitoren verhindert werden [86].

1.3 Ziel der Arbeit

Nachdem Vane 1971 das Wirkprinzip der Acetylsalicylsäure, die Blockade der Cyclooxygenase im Arachidonsäurestoffwechsel, aufklärte, brach ein Boom in der Prostaglandinforschung aus (Abbildung 1-6). Die Publikationen, die in PubMed (www.pubmed.gov) zum Thema Prostaglandine gelistet wurden, stiegen seit dem kontinuierlich an und umfassen zurzeit etwa 3500 Publikationen pro Jahr. Andere Wege des Arachidonsäurestoffwechsels, z.B. die Bildung von EETs, sind in dieser Grafik nicht berücksichtigt, da sie erst in den letzten 10 Jahren populär wurden.

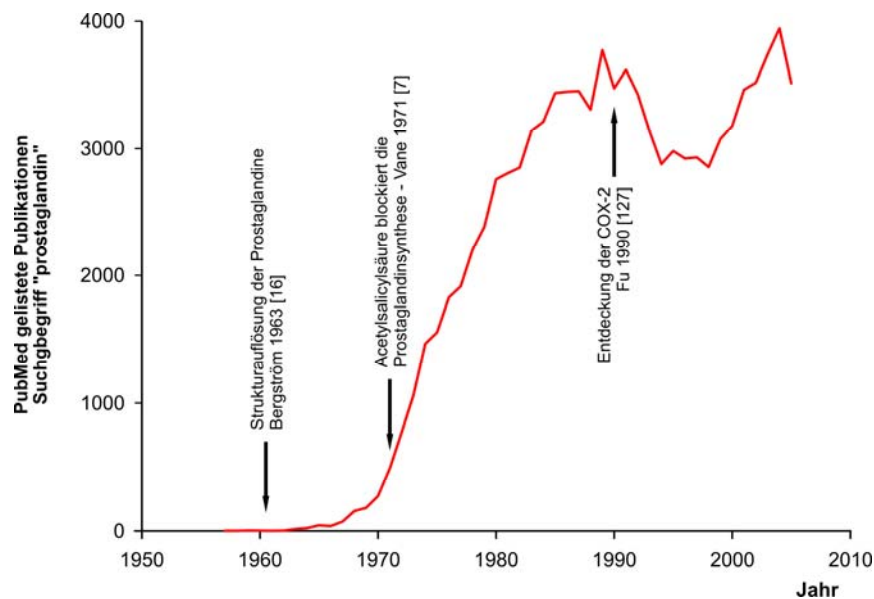


Abbildung 1-6: In PubMed eingetragene Publikationen pro Jahr seit 1957 mit dem Suchbegriff "prostaglandin".

Obwohl Prostaglandine und auch andere Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels immer wichtiger werden, basiert ihre Bestimmung in verschiedenen biologischen Matrices hauptsächlich auf Immunoassays und chromatographischen Verfahren wie HPLC, GC und CE. Immunoassays besitzen zwar eine hohe Sensitivität, zeigen aber durch die enorme Vielfalt der physiologischen vorkommenden Eicosanoide Kreuzreaktionen und können so zu falschen Ergebnissen führen. Das Problem der Kreuzreaktion kann zwar durch eine chromatographische Trennung mit HPLC, GC oder CE vermindert werden, allerdings ist die Empfindlichkeit der üblichen UV-, Fluoreszenz- oder Verbrennungsdetektoren für die Eicosanoidanalytik oft nicht ausreichend. GC-MS/MS-Eicosanoid-Methoden sind zwar sensitiver als vergleichbare LC-MS/MS-Methoden, benötigen aber einen Derivatisierungsschritt und eine komplizierte Aufreinigung, um das Derivatisierungsreagenz zu entfernen. Aufgrund dieser Vorteile, sollten verschiedene LC-MS/MS-Methoden entwickelt werden, mit denen biologische Funktionen der Eicosanoide untersucht werden können.

2. Theoretische Grundlagen zur Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie

2.1 Einleitung

Die Entwicklung von Massenspektrometern geht auf zahlreiche Physiker zurück, die Ende des 19. Jahrhunderts an der Aufklärung des Atomaufbaus arbeiteten. Sir Joseph John Thomson, der 1897 das Elektron entdeckte [87] und dafür 1906 mit dem Nobelpreis für Physik ausgezeichnet wurde, verwendete in der ersten Dekade des 20. Jahrhunderts zum ersten Mal eine Vakuumröhre, elektrische Felder und einen fluoreszierenden Schirm, um Ionen zu detektieren. Er entwickelte den ersten "parabolischen Spektrographen" mit dem es ihm nicht nur möglich war, die Massenspektren von Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid aufzunehmen, sondern er konnte damit auch zeigen, dass Neon aus zwei verschiedenen Isotopen besteht (^{20}Ne und ^{22}Ne).

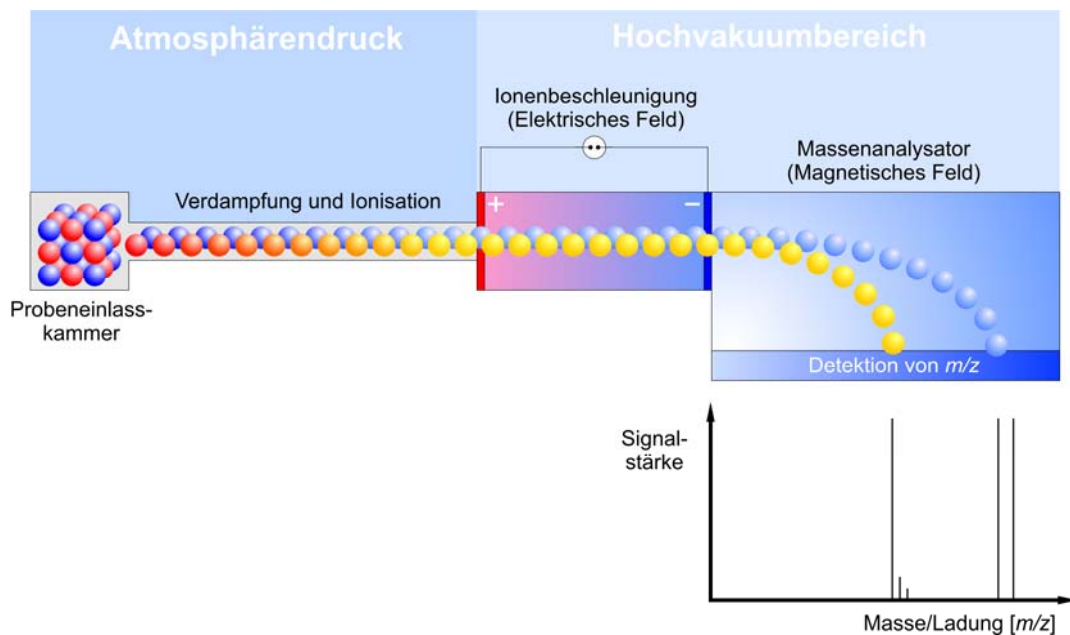


Abbildung 2-1: Grundprinzip und Funktionsweise eines Massenspektrometers.

Grundprinzip eines jeden Massenspektrometers ist die Erzeugung und Detektion von Ionen. Neben der Molekülmasse können damit auch Aussagen über die Isotopenverteilung, die Zusammensetzung, aber auch Rückschlüsse über die Struktur unbekannter Analyten getroffen werden. Aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Vielseitigkeit werden Massenspektrometer z.B. in der Atomphysik, Geochronologie und allen Formen der chemischen Analytik eingesetzt [88].

Der Aufbau von Massenspektrometern ist bei sämtlichen erhältlichen Bauarten sehr ähnlich. Sie bestehen aus den vier Komponenten Probeneinlasssystem, Ionisationssystem, Massenanalysator und Massendetektor (Abbildung 2-1). In der Probeneinlasskammer wird die zu untersuchende Probe in das

System eingebracht und dort fortlaufend in gasförmige Ionen überführt. Der entstehende Ionenstrahl wird anschließend mit Hilfe einer elektrischen Beschleunigungsspannung in den Massenanalysator geleitet und nach seinem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetrennt. Im letzten Schritt konvertieren verschiedene Detektorsysteme die einfallenden Ionen in ein Massenspektrum, in welchem die relativen Signalintensitäten gegen das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) aufgetragen werden. Ein Hochvakuum im Inneren des Massenspektrometers verhindert eine Kollision der produzierten Ionen mit Luftmolekülen und stabilisiert dadurch ihre Flugbahn. Die größten Unterschiede der verschiedenen Massenspektrometer bestehen im Bau und Funktionsweise des Massenanalysators und der Massendetektionseinheit.

In den Anfängen der Massenspektrometrie war es zunächst nur möglich, Gase zu untersuchen. Um auch leicht verdampfbare Feststoffe massenspektrometrisch untersuchen zu können, verwendete Dempster 1918 [89] zum ersten Mal einen Elektronenstrahl zur Ionisierung (Elektronenstoßionisation, engl. *electron impact*, EI). Die zur Ionisierung nötige hohe Energie des Elektronenstrahls hatte allerdings den Nachteil, dass die Verbindungen zu kleineren Fragmenten zerbrachen und der Molekülpeak (M^+ oder M^-), der der gesamten Molekülmasse der untersuchten Verbindung entspricht, nicht oder nur sehr schwach zu sehen war. Die Fragmente waren allerdings für eine bestimmte Verbindung sehr spezifisch und konnten daher zu deren Identifizierung herangezogen werden.

2.1.1 LC-MS-Kopplung

Die ersten Experimente, um Flüssigkeitschromatographie und Massenspektrometrie miteinander zu koppeln, wurden in den späten 60er Jahren von Dole mit Makromolekülen durchgeführt [90,91] und basierten auf dem Elektrospray-Prozess, der bereits 1937 von Chapman beobachtet wurde [92]: Eine Flüssigkeit und die darin enthaltenen Substanzen werden durch den Einfluss einer Hochspannung ionisiert und zerstäubt. Aufgrund verschiedener Schwierigkeiten bei der Ionisierung von Makromolekülen (Polystyrol) stellte die Arbeitsgruppe um Dole ihre Arbeiten nach einigen Jahren jedoch wieder ein. 1984 griff Fenn die LC-MS-Kopplung erneut auf und begann nicht wie Dole Makromoleküle zu untersuchen, sondern kleine Moleküle mit einer Masse unter 450 amu [93,94]. Er entwickelte ein Interface, das den Analyten ionisiert, das Lösungsmittel der HPLC entfernt und den Analyten schließlich in die Gasphase überführt (engl. *electrospray ion source*, ESPI). Nach zahlreichen Verbesserungen des Interface stellte sich sehr schnell heraus, dass mit Hilfe der Elektrospray-Ionisierung sowohl kleine Moleküle, Proteine aber auch Peptide analysiert werden können [95]. Für die Entwicklung der LC-MS-Kopplung mit Hilfe des Elektrospray-Ionisierungs-Interface wurde Fenn 2002 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

2.1.2 Elektrospray-Ionisation (ESI)

Die meisten erhältlichen Massenspektrometer im bioanalytischen Bereich verwenden zur Ionisierung der Analyten ein Interface auf Basis des Elektrosprays. Das Interface-Gehäuse enthält eine Stahlkapillare, die mit dem Ende der HPLC-Säule verbunden ist und an der eine Hochspannung von etwa 3 bis 6

kV anliegt. Die Polarität dieser Hochspannung richtet sich nach dem Ionenmodus des Analyten: Anionen, z.B. Analyten mit funktionellen Carbonsäure-Gruppen, werden üblicherweise im negativen Ionenmodus detektiert; Kationen, z.B. Analyten mit funktionellen Amino-Gruppen, werden dagegen im positiven Ionenmodus detektiert. Im Falle der Detektion von Kationen wird die Stahlkapillare zur Anode, wodurch Anionen an die Stahlwandung fließen und Kationen sich am Ende der Kapillaren sammeln (Abbildung 2-2, Ausschnittsvergrößerung) und in Richtung Kathode gezogen werden. Durch diesen elektrischen Sog bildet sich ein „Taylor-Konus“ [96,97], aus dem sich mehrfach positiv geladenen Flüssigkeitstropfen abtrennen (Durchmesser: wenige μm). Die Bildung von geladenen Tröpfchen erfolgt am leichtesten bei geringer Fließgeschwindigkeit, bei geringer Elektrolytkonzentration und bei geringer Oberflächenspannung des HPLC-Laufmittels. Die größere Oberfläche des Flüssigkeitstropfens führt zu Verdampfung von Lösungsmittelmolekülen und somit zu geringerer Tröpfchengröße.

Elektrospray-Prozess

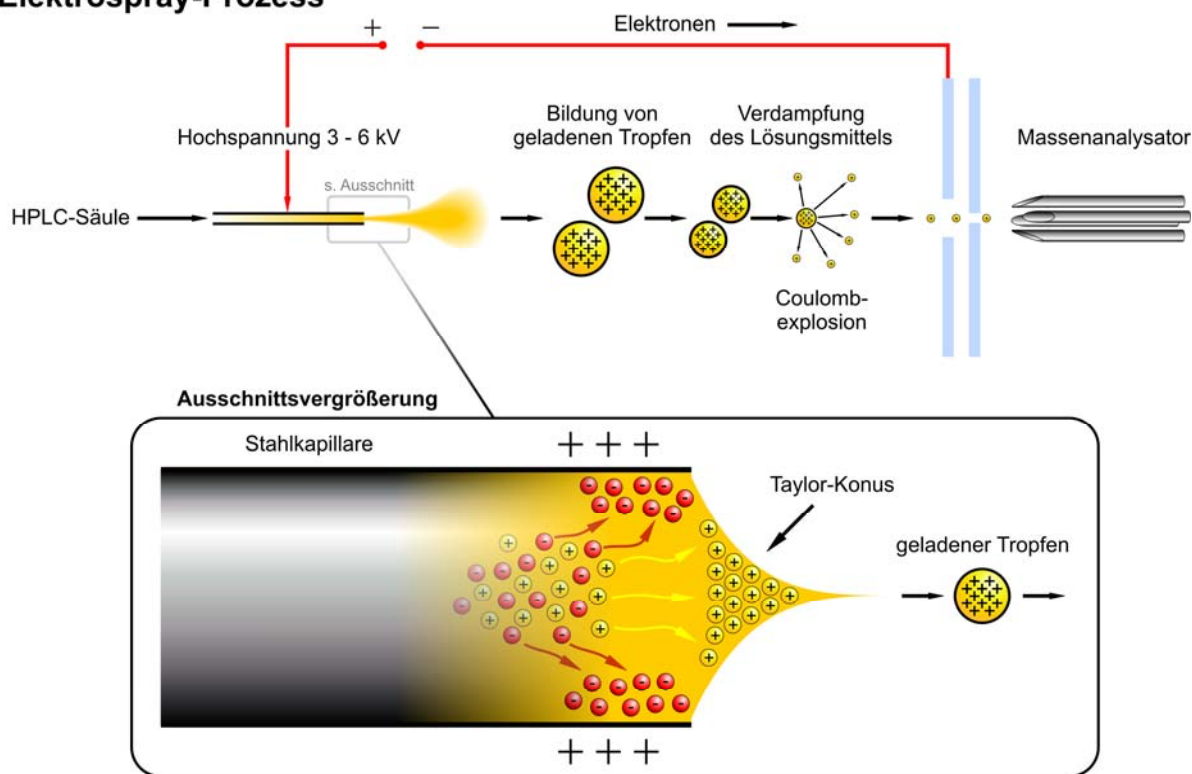


Abbildung 2-2: Der Elektrospray-Prozess.

Da Ionen aus der flüssigen Phase nicht entweichen können, steigt die Ladungsdichte mit sinkendem Tröpfchenradius an. Wird allerdings eine bestimmte Tröpfchengröße, das „Rayleigh-Limit“ (Formel 2-1), unterschritten, so stoßen sich die gleichnamigen Ladungen der Ionen untereinander ab und eine Coulomb-Explosion reißt den Tropfen auseinander. Die resultierenden kleineren Tröpfchen durchlaufen wieder den Verdampfungsprozess und zerfallen weiter durch Explosion. Am Ende dieser Kaskade

können bei einer Tröpfchengröße von ~ 10 nm freie gasförmige Ionen entstehen, die über ein elektrisches Linsensystem in das Massenspektrometer fokussiert werden.

$$d = \sqrt[3]{\frac{q^2}{8 \cdot \pi^2 \cdot \epsilon_0 \cdot \gamma}}$$

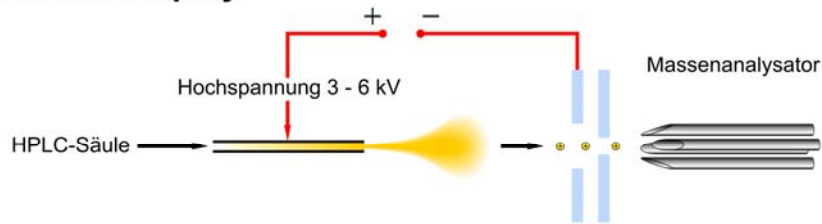
Formel 2-1: Rayleigh-Limit. Abkürzungen: q = Ladung, γ = Oberflächenspannung, ϵ_0 = Dielektrizitätskonstante, d = Tröpfchendurchmesser.

Bis heute ist immer noch nicht genau bekannt, wie sich Gasphasenionen bilden. Das *charged-residue-Model* (CRM) geht davon aus, dass am Ende der Kaskade Tröpfchen entstehen, die mehrere Ladungen tragen, aber nur ein einziges Analytmolekül enthalten [90,91]. Nach Verdampfung des Lösungsmittels wird zeitgleich die letzte vorhandene Ladungen auf das Analytmolekül übertragen und ein Gasphasenion erzeugt. Nach dem *ion-evaporation-Model* (IEM) liegen Tröpfchen vor, die zwar ebenfalls mehrere Ladungen tragen, aber im Gegensatz zum *charged-residue-Model*, auch zahlreiche Analytenmoleküle enthalten [98,99]. Erreichen die Tröpfchen das Rayleigh-Limit, so werden bei weiterer Lösungsmittelverdampfung kontinuierlich Gasphasenionen aus den Tröpfchen emittiert.

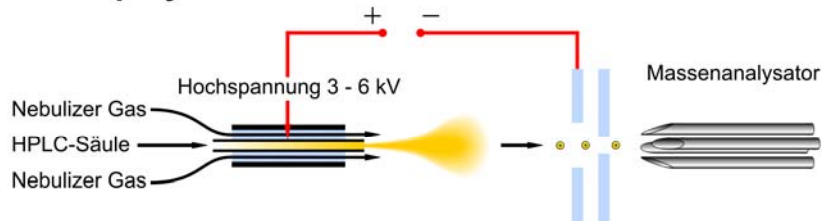
Leider war das von Fenn konstruierte Interface nur in der Lage, Flüsse von max. 120 $\mu\text{l/min}$ zu ionisieren, und damit nur bedingt geeignet, um HPLC und Massenspektrometrie miteinander zu koppeln (Elektrospray, Abbildung 2-3 A). Typische HPLC-Trennungen benötigen einen Fluss von ca. 100 $\mu\text{l/min}$ bis zu mehreren ml/min , weshalb zusätzlich ein Zerstäubergas (*nebulizer gas*) eingesetzt wurde, um die Sprayoberfläche zu vergrößern und die Ionenausbeute zu erhöhen (IonSpray, Abbildung 2-3 B). Das IonSpray ermöglichte immerhin eine maximale Fließgeschwindigkeit der HPLC von ca. 200 $\mu\text{l/min}$. Erst der Einsatz eines Heizgases, das die bei der Verdampfung des HPLC-Lösungsmittels auftretende Verdunstungskälte kompensiert, ließ die Kopplung von HPLC und Massenspektrometrie ohne größere Einschränkung der Fließgeschwindigkeit zu (TurboIonSpray, Abbildung 2-3 C). Die Fließgeschwindigkeit sollte bei hohem organischem Anteil kleiner als 1 ml/min sein, um ein vollständiges Verdampfen des Lösungsmittels zu gewährleisten. Um noch größere Fließgeschwindigkeiten verwenden zu können, wurde das Turbo-V-Spray entwickelt (Abbildung 2-3 D). Durch die Verwendung von zwei Heizgasen können Fließgeschwindigkeiten von ca. 2 ml/min erreicht werden und zusätzlich gelangen durch die senkrechte Anordnung der Elektrospray-Nadel weniger Lösungsmittelmoleküle in das Innere des Massenspektrometers, was die Signalstabilität erhöht.

Streng genommen definiert der Begriff „Elektrospray“ nur die Vorgänge, die nach der Ionisierung stattfinden. Da diese Vorgänge aber bei allen drei Sprayverfahren identisch sind, ist eine Einteilung in Elektrospray, IonSpray, TurboIonSpray und Turbo-V-Spray eigentlich überflüssig. In der gängigen Literatur werden deshalb die verschiedenen Sprayverfahren als Synonym für den Bau des Interface verwendet. Die TurboIonSpray-Quelle wird auf der Anlage I (API 3000) verwendet. Auf Anlage II (API 4000) wird dagegen die effektivere Turbo-V-Spray-Quelle eingesetzt.

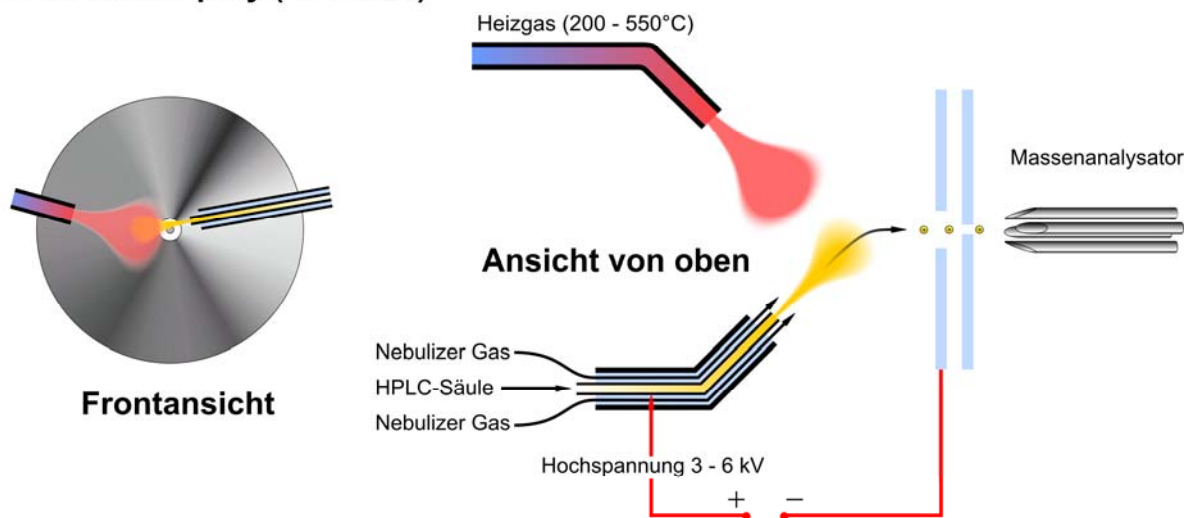
A. Elektrospray



B. IonSpray



C. TurbolonSpray (API 3000)



D. Turbo-V-Spray (API 4000)

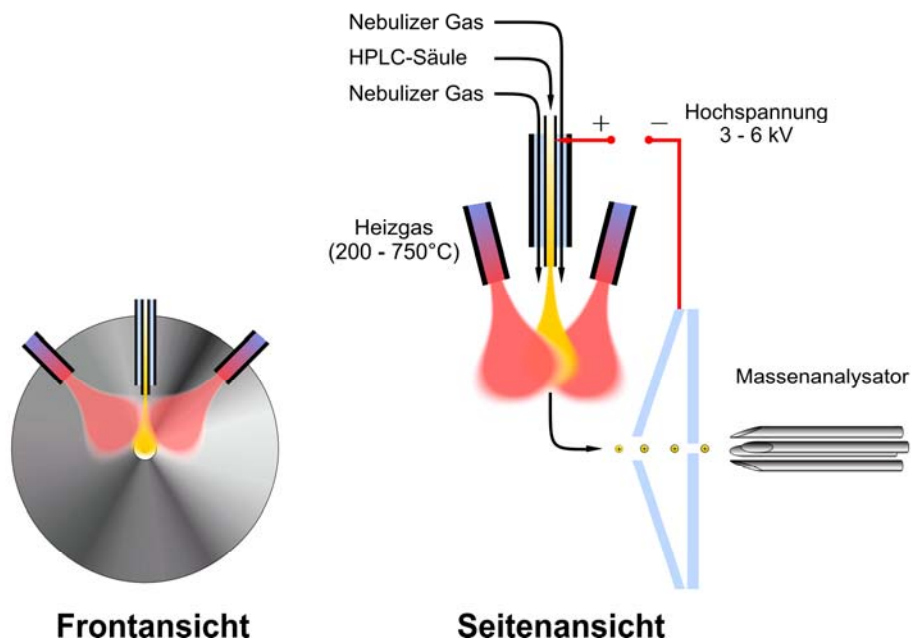


Abbildung 2-3: Schematischer Aufbau der verschiedenen Elektrospray-Verfahren.

2.1.3 Kopplung von Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

Alle Analysenmethoden, die in der vorliegenden Arbeit entwickelt wurden, beruhen auf der Kopplung von Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Tandem-Massenspektroskopie (MS/MS), die sich in der letzten Dekade zu einem Standard in analytischen Laboratorien entwickelt hat [88,100,101]. Zwar ist die Anschaffung eines LC-MS/MS-Systems noch immer sehr teuer, aber dafür bietet es wesentlich höhere Sensitivitäten und Selektivitäten als die üblichen UV- oder Fluoreszenzdetektoren der HPLC. Weitere Vorteile gegenüber herkömmlicher HPLC liegen in der einfacheren Probenaufarbeitung, schnelleren Methodenentwicklung und wesentlich kürzeren Analysenzeiten. Generell kann jeder Massenanalysator [102] über ein entsprechendes Interface mit einer HPLC-Anlage gekoppelt werden, doch werden aufgrund ihrer Einfachheit, geringen Größe und relativ günstigen Preises meist Quadrupole [103-105] eingesetzt. Diese können so konfiguriert werden, dass entweder nur Ionen mit einem bestimmten Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) oder alle Ionen mit einem unterschiedlichen Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) ein Quadrupol passieren können. Im ersten Fall arbeitet das Quadrupol als reiner Massenfilter und im zweiten als elektrische Linse (*Rf*-Quadrupol), um einen Ionenstrahl zu fokussieren oder weiterzuleiten.

In einem typischen Tandem-Massenspektrometer kommen sowohl zwei filternde Quadrupole (Abbildung 2-4, Q_1 und Q_3) als auch zwei *Rf*-Quadrupole (Abbildung 2-4, Q_0 und Q_2) zum Einsatz [106]. Das erste Quadrupol Q_0 fungiert als elektrische Linse und dient dazu, den Ionenstrahl, der im Elektrospray-Interface (ESI-Quelle) unter Atmosphärendruck entsteht, in ein Hochvakuum zu transportieren. Gleichzeitig wird die Solvathülle der Analyten entfernt und Neutralkmoleküle daran gehindert, weiter in das Massenspektrometer vorzudringen. Anschließend wird das Quadrupol Q_1 so konfiguriert, dass nur die Masse des ionisierten Analyten Q_1 passieren kann. Alle anderen Ionen werden von Q_1 ausgeblendet. Im nächsten Abschnitt gelangt der Analyt in eine geschlossene Zelle (Stoßzelle), die das *Rf*-Quadrupol Q_2 enthält und mit Stickstoff gefüllt ist.

Der Analyt wird durch Kollision mit Stickstoffmolekülen zu Schwingungen angeregt, worauf er in spezifische Fragmente zerbricht. Durch den Linsencharakter von Q_2 werden sämtliche geladenen Fragmente des Analyten zum letzten Quadrupole Q_3 transportiert. Das Massenfilter Q_3 wird in der Regel so eingestellt, dass nur das Fragment mit dem größten Signal-Rausch-Verhältnis den Detektor erreichen und ein Signal verursachen kann. Bei Tandem-Massenspektrometrie wird somit nicht der Analyt selbst, sondern eines seiner spezifischen Fragmente detektiert. Aufgrund dessen wird der Ausdruck „Massenübergang“ (engl. *transition*) verwendet und m/z des Analyten und m/z des Fragments angegeben: m/z [Analyt] \rightarrow m/z [Fragment]. Diese Funktionsweise ist für die hohe Selektivität und Sensitivität verantwortlich und ermöglicht die Verkürzung der Analysenzeiten, da Analyten vor der Detektion nicht mehr unbedingt chromatographisch getrennt werden müssen.

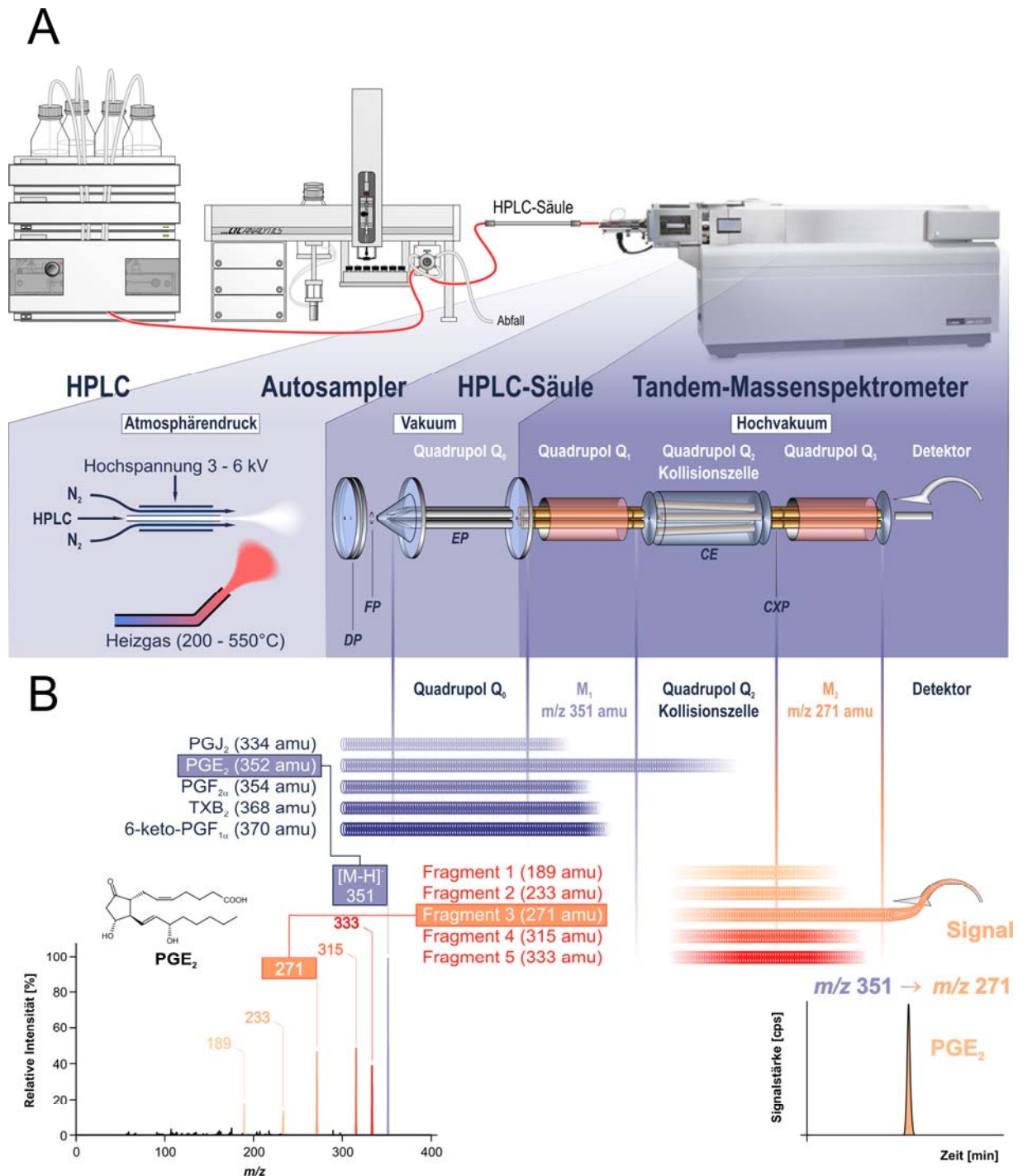


Abbildung 2-4: Aufbau und Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems auf Basis eines API 3000-Tandem-Massenspektrometers. **A.** Das System besteht aus den vier Teilen HPLC, Autosampler, HPLC-Säule und Massenspektrometer. Das Tandem-Massenspektrometer kann weiter in verschiedene Teilbereiche untergliedert werden. Die Ionisierung der Analyten und Verdampfung des HPLC-Lösungsmittels erfolgt im Elektrospray-Interface unter Atmosphärendruck mit Hilfe eines heißen Stickstoffstroms. Verschiedene elektrische Linsensysteme fokussieren die ionisierten Analyten in den Hochvakuumbereich des Massenspektrometers, wo sie aufgrund ihres Masse-zu-Ladungsverhältnisses von Quadrupolen aufgetrennt werden. **B.** Die 5 Prostaglandine PGI_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, TXB_2 und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ gelangen nach einer Injektion zur gleichen Zeit in das Massenspektrometer und werden unter Verlust eines Protons negativ ionisiert. Da Q_0 als R_f -Quadrupol arbeitet, können alle 5 Ana-

lyten in den Hochvakuumbereich gelangen. Um PGE_2 selektiv zu bestimmen, wird Q_1 auf $[\text{M-H}]^+$ von PGE_2 gesetzt (351 amu). Alle anderen Prostaglandine sind unter dieser Konfiguration im Q_1 instabil und nur PGE_2 kann die Kollisionszelle erreichen. Durch Kollision mit Stickstoff entstehen aus PGE_2 die spezifischen Fragmente mit m/z 189, m/z 233, m/z 271, m/z 315 und m/z 333. Aufgrund des *Rf*-Charakters der Kollisionszelle, können alle Fragmente Q_3 erreichen. Aufgrund von Vorversuchen ist bekannt, dass m/z 271 den sensitivsten Peak (größtes S/N-Verhältnis) verursacht. Deswegen wird Q_3 so konfiguriert, dass nur m/z 271 passieren kann und ein Signal am Detektor hervorruft. Der Peak im Chromatogramm resultiert somit nicht von PGE_2 selbst, sondern von seinem spezifischen Fragment m/z 271 (Massenübergang m/z 351 \rightarrow m/z 271). Abkürzungen: DP = *declustering potential*, FP = *focusing potential*, EP = *entrance potential*, CE = *collision energy*, CXP = *cell exit potential*.

Der Name „Tandem-Massenspektrometrie“ leitet sich von den zwei in Reihe stehenden, filternden Quadrupolen Q_1 und Q_3 ab. Da das *Rf*-Quadrupol Q_0 für das Prinzip des Tandem-Massenspektrometers nicht erforderlich ist und manche Hersteller bauartbedingt komplett darauf verzichten, hat sich auch der Begriff „Triple-Quadrupol“ etabliert.

Ein Triple-Quadrupol kann in verschiedenen Modi betrieben werden (Abbildung 2-5): Die wichtigsten sind der Produkt-Ionen-Scan (engl. *Product-Ion-Scan*) und das *Multiple-Reaction-Monitoring* (MRM). Der Produkt-Ionen-Scan wird dazu verwendet, um Massenspektren von Verbindungen aufzunehmen. Dazu wird Q_1 so eingestellt, dass nur das m/z -Verhältnis der gesuchten Verbindung in die Stoßzelle gelangen kann. Durch Kollision mit Stickstoff entstehen im *Rf*-Quadrupol Q_2 die spezifischen Fragmente der Verbindung, die allesamt Q_3 erreichen. Während Q_1 statisch arbeitet und nur Verbindungen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis passieren lässt, führt Q_3 permanent einen Scan aller m/z -Verhältnisse aus und detektiert damit alle Fragmente, die aus der Verbindung entstehen (Abbildung 2-5 A). Zur Quantifizierung von Verbindungen wird hauptsächlich der MRM-Modus eingesetzt, der auf den Ergebnissen des Produkt-Ionen-Scans aufbaut. Dazu wird Q_1 auf das m/z -Verhältnis der gesuchten Verbindung eingestellt, so dass nur die gesuchte Verbindung die Stoßzelle erreichen kann. Durch Kollision mit Stickstoff entstehen spezifische Fragmente, die alle durch das *Rf*-Quadrupol Q_2 an Q_3 übergeben werden. Q_3 wird auf das m/z -Verhältnis des empfindlichsten Fragments eingestellt, das aus einem Vorversuch mit Hilfe des Produktionenscans ermittelt wird. Innerhalb weniger Millisekunden wird die Konfiguration von Q_1 und Q_3 so verändert, dass eine zweite Verbindung mit einem anderen spezifischen Fragment detektiert wird (Abbildung 2-5 B). Durch diese Konfigurationsänderung können im MRM-Modus bis zu 50 verschiedene Substanzen pro Sekunde detektiert werden. Für den MRM-Modus ist es eigentlich nicht notwendig, eine chromatographische Trennung durchzuführen. Um aber signalbeeinflussende Effekte der Matrix (z.B. salzhaltige Lösungen oder Humanplasma) zu minimieren und die optimale Empfindlichkeit zu erhalten, ist die Verwendung einer Trennsäule trotzdem ratsam.

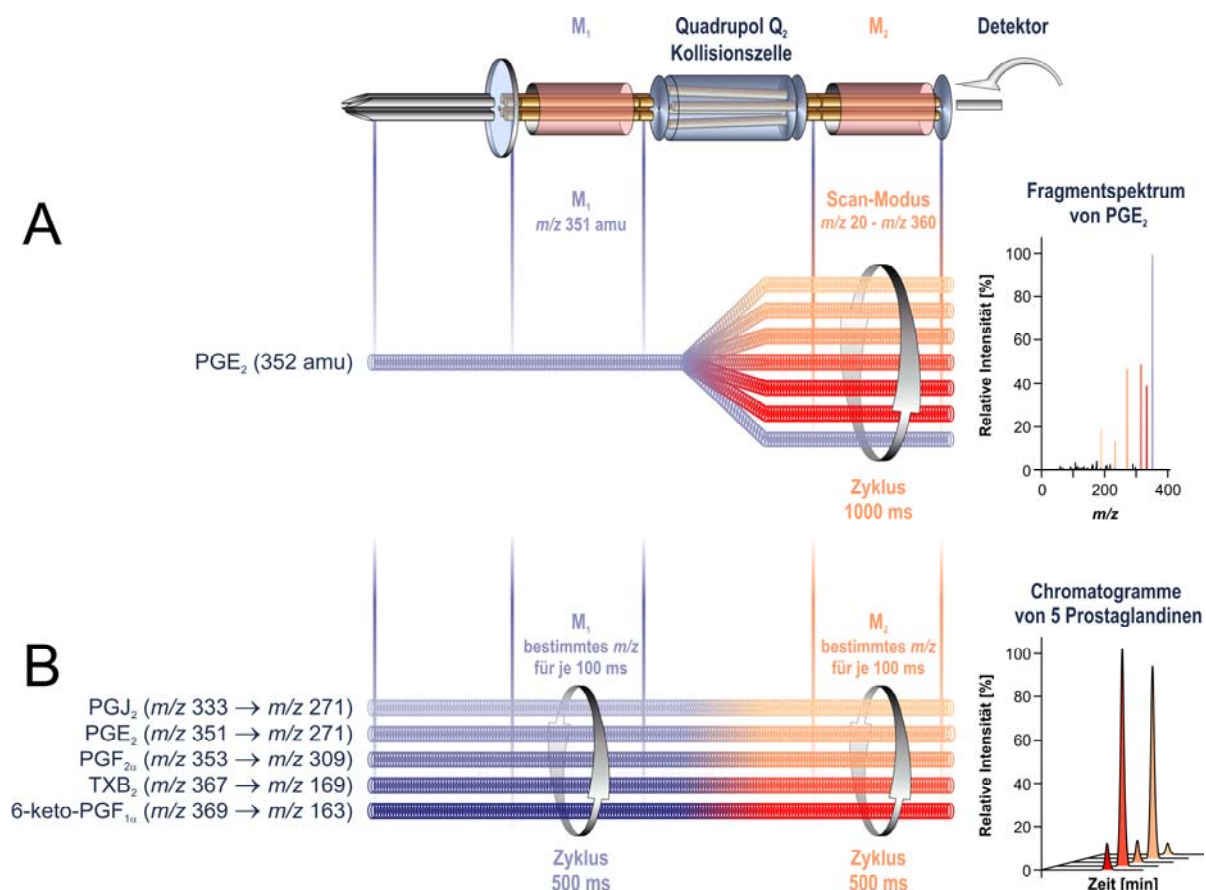


Abbildung 2-5: Funktionsweise des Produkt-Ionen-Scans und des MRM-Modus eines Tandem-Massenspektrometers. **A.** Produkt-Ionen-Scan. Um das Fragmentspektrum von PGE₂ zu erhalten, wird eine PGE₂-Lösung mit einer Spritze in das Massenspektrometer infundiert und Q_1 fest auf m/z 351 eingestellt. Nach der Fragmentierung in der Kollisionszelle scannt Q_2 alle Massen zwischen m/z 20 und m/z 360 (oder höher) zyklisch innerhalb von 1000 ms (typische Einstellung) ab und stellt alle gefundenen Fragmente in einem Fragmentspektrum dar. **B.** MRM-Modus. Um Chromatogramme zu erhalten werden die empfindlichsten Fragmente für jede Verbindung verwendet. Nach jeweils 100 ms ändert sich die Konfiguration von Q_1 und Q_3 gleichzeitig, so dass nun eine andere Verbindung detektiert wird. Innerhalb eines MRM-Zyklus wird so für jeden Analyt ein Datenpunkt aufgenommen. Wird im MRM-Modus eine Trennsäule verwendet, so werden die Peaks zeitlich versetzt aufgenommen.

Um die bestmögliche Empfindlichkeit für einen Analyten zu erhalten, können verschiedenen Spannungen optimiert werden. Um die Ionenausbeute zu erhöhen werden *focusing-* (FP) und *declustering-potential* (DP) angepasst. Diese beiden Potentiale sind abhängig von der Struktur des Analyten. Fragmentspezifische Potentiale sind die *collision energy* (CE) und das *cell-exit-potential* (CXP) des Tandem-Massenspektrometers.

In der vorliegenden Arbeit wurden Fragmentspektren auf einem API 3000 und dem Nachfolgemodell API 4000 aufgenommen. Aufgrund der veränderten ESI-Quelle des API 4000 gelangen wesentlich weniger Lösungsmittelmoleküle ins Innere des Massenspektrometers, weshalb kein *focusing-potential*

(FP) mehr benötigt wird. Standardmäßig ist bei beiden verwendeten Massenspektrometern das *entrance-potential* (EP) auf -10 V im negativen Ionenmodus eingestellt. Auf eine Optimierung wurde beim API 3000 verzichtet, da sämtliche Analyten bei etwa -8 bis -15 V ein maximales Plateau zeigten und eine Empfindlichkeitssteigerung nicht mehr möglich war.

2.2 Methodenvalidierung

Um die Eignung einer analytischen Methode für die Quantifizierung eines Analyten aus einer biologischen Matrix festzustellen, ist eine ausführliche Methodenvalidierung absolut notwendig. In der Literatur sind verschiedene Richtlinien und Vorschläge zu finden, wie eine Methodenvalidierung durchzuführen ist, aber diese basieren auf der Annahme, dass der Analyt in der zu untersuchenden Matrix normalerweise nicht vorkommt, wie z.B. ein Arzneistoff in Humanplasma. Eicosanoide sind allerdings physiologisch vorkommende Substanzen und es ist daher unmöglich, eine Eicosanoid-freie biologische Matrix zu gewinnen. Es wäre zwar theoretisch denkbar, die gewonnene Matrix von Eicosanoiden für die Methodenvalidierung zu befreien, z.B. über Antikörper, Ausfällen oder Extrahieren, aber die Aufreinigungsschritte hätten immer eine Veränderung der biologischen Matrix zur Folge. In der Eicosanoidanalytik wird deshalb oft auf Ersatzflüssigkeiten (z.B. ACSF, PBS, Zellmedium) zurückgegriffen, die eine ähnliche Zusammensetzung wie die zu untersuchende biologische Matrix aufweisen und frei von Eicosanoiden sind. Zusätzlich wird durch Zugabe von definierten Eicosanoid-Standards zur biologischen Matrix die Eignung der entwickelten Methode überprüft.

Sämtliche Validierungsmethoden basieren auf Vorschlägen der FDA [107] und *Journal of Chromatography B* [108]. Die Parameter, die bei einer Validierung unbedingt ermittelt werden müssen, sind Selektivität, Richtigkeit, Konzentrationsbereich, Präzision, Wiederfindung, Effekte der Matrix, Sensitivität und Stabilität. In den nachfolgenden Beschreibungen der verschiedenen Validierungsmethoden wird zwar der Terminus biologische Matrix verwendet, aber er wird hier als Synonym für die in der Eicosanoidanalytik üblichen Ersatzflüssigkeiten benutzt. Für alle Validierungsschritte wird normalerweise die biologische Matrix von 6 Individuen benötigt, aber im Falle von Ersatzflüssigkeiten ist dies in der Praxis nicht durchführbar.

2.2.1 Selektivität

Unter der Selektivität einer analytischen Methode versteht man die Fähigkeit, jeden Analyten neben anderen Substanzen identifizieren und quantifizieren zu können. Für die Bestimmung der Selektivität werden 6 Leerproben der biologischen Matrix (Doppelblindproben) auf Störpeaks untersucht. Es darf kein Störpeak bei der zu erwartenden Retentionszeit auftreten.

Als interne Standards dienen bei LC-MS/MS-Methoden deuterierte Prostaglandine, die allerdings nie ganz isotonenrein herzustellen sind und immer Spuren des zu untersuchenden Analyten enthalten. Um Kreuzreaktionen mit dem eigentlichen Analyten auszuschließen, werden deswegen 6 Leerproben der biologischen Matrix mit der Stoffmenge an internem Standard (Blindproben) versetzt, die in der Methode verwendet werden soll. Es darf kein Störpeak bei der zu erwartenden Retentionszeit des Analy-

ten auftreten. Sind Störpeaks in den Blindproben (Leermatrix plus internen Standard) des Analyten aber nicht in den Doppelblindproben (nur Leermatrix) sichtbar, so muss die Konzentration an internem Standard verringert werden. Die Störpeaks dürfen maximal 20 % der Peakhöhe des niedrigsten Standards betragen.

2.2.2 Richtigkeit und Konzentrationsbereich

Die Richtigkeit einer analytischen Methode beschreibt die Abweichung einer quantifizierten Standardprobe gegenüber ihrer richtigen Konzentration. Dazu werden 6 Standardreihen, die aus mindestens 6 Standards bestehen soll, aus der biologischen Leermatrix von 6 Individuen hergestellt und hintereinander vermessen. Anschließend wird das Verhältnis der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des internen Standards errechnet und anhand dieser Werte eine Eichgerade erstellt. Die Konzentrationen der Standardproben dürfen nicht mehr als 15 % von der richtigen Konzentration abweichen. Die Richtigkeit der analytischen Methode gilt als ausreichend, wenn die Standardabweichung weniger als 15 % beträgt. Der Konzentrationsbereich der Standardreihen sollte so dimensioniert sein, dass dieser die eigentlich zu bestimmenden Proben mit einschließt.

2.2.3 Präzision

Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt die mittlere Abweichung einer Standardprobe von ihrer richtigen Konzentration, wenn diese mehrmals hintereinander bestimmt wird. Da die Präzision von verschiedenen Parametern, wie zum Beispiel Temperatur, Lösungsmittelzusammensetzungen und Sauberkeit des Massenspektrometers, abhängen kann, wird sie an vier verschiedenen Tagen durchgeführt. Dazu werden mindestens 3 verschiedene Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) mit der biologischen Leermatrix eines Individuums angesetzt, extrahiert und mindestens 6 Mal nacheinander in das LC-MS/MS-System injiziert. Für jede Injektion wird das Verhältnis aus Analyt und internem Standard berechnet und daraus eine Eichgerade erstellt. Als Maß für die Präzision wird für jede Konzentration die relative Standardabweichung der Peakflächenverhältnisse ermittelt, die nicht mehr als 15 % betragen darf. Die Intraday-Präzision wird am ersten Tag bestimmt und die Präzisionen aller vier Tage werden zur Berechnung der Interday-Präzision verwendet.

2.2.4 Sensitivität

Die Sensitivität einer analytischen Methode wird mit Hilfe der Quantifizierungsgrenze wiedergegeben. Als Quantifizierungsgrenze wird die Konzentration einer Standardprobe festgelegt, bei der die Richtigkeit, Intraday- und Interday-Präzision nicht mehr als 15 % betragen. Die FDA erlaubt zwar 20 % an der Quantifizierungsgrenze, jedoch liegen Prostaglandin-Konzentrationen oft sehr nahe an der Quantifizierungsgrenze, weshalb die Grenzen für Bestimmung der Richtigkeit, Intraday- und Interday-Präzision auf 15 % hochgesetzt wurden.

2.2.5 Wiederfindung

Die Wiederfindung einer analytischen Methode wird in eine relative und in eine absolute Wiederfindung unterschieden. Die relative Wiederfindung ist ein Maß für die Effizienz der Extraktionsmethode und errechnet sich aus dem Verhältnis der Peakfläche einer extrahierten Standardprobe bekannter Stoffmenge des Analyten und der Peakfläche einer extrahierten Leermatrix, die nach der Extraktion mit der gleichen Stoffmenge der Standardprobe versetzt wurde (Formel 2-1)

$$Wiederfindung_{rel} = \frac{AUC_{\text{extrahierte Standardprobe mit } n(\text{Analyt})}}{AUC_{\text{extrahierte Leermatrix dotiert mit } n(\text{Analyt})}} \cdot 100\%$$

Formel 2-1: Berechnung der relativen Wiederfindung. Abkürzungen: AUC = Peakfläche; n = Stoffmenge.

Dagegen ist die absolute Wiederfindung das Verhältnis der Peakfläche einer extrahierten Standardprobe bekannter Stoffmenge und der Peakfläche eines Lösungsmittelstandards mit der gleichen Stoffmenge der Standardprobe (Formel 2-2). Sie ist ein Maß für die Fähigkeit, unerwünschte signalbeeinflussende Matrixbestandteile abzutrennen.

$$Wiederfindung_{abs} = \frac{AUC_{\text{extrahierte Standardprobe mit } n(\text{Analyt})}}{AUC_{\text{Lösungsmittelstandard mit } n(\text{Analyt})}} \cdot 100\%$$

Formel 2-2: Berechnung der absoluten Wiederfindung. Abkürzungen: AUC = Peakfläche; n = Stoffmenge.

Für die Berechnung von relativer und absoluter Wiederfindung werden mindestens 3 verschiedene Konzentrationen (niedrig, mittel, hoch) benötigt. Die höchste Konzentration ist automatisch das obere Ende des Konzentrationsbereichs und die niedrigste Konzentration sollte am unteren Ende des Konzentrationsbereichs liegen. Jede Konzentration wird 6 Mal mit verschiedenen Leermatrices angesetzt und extrahiert.

Es ist nicht notwendig eine Extraktionsmethode zu entwickeln, die 100 % Wiederfindung aufweist, allerdings müssen sowohl relative als auch absolute Wiederfindung über den gesamten Konzentrationsbereich konstant sein. Zusätzlich darf die Wiederfindung des internen Standards von der Wiederfindung des Analyten um nicht mehr als 15 % abweichen.

2.2.6 Matrixeffekte

Um signalverstärkende oder signalsupprimierende Effekte der Matrix und die Eignung des internen Standards zu bestimmen, werden je 6 Proben von 6 verschiedenen Leermatrices extrahiert, mit Stickstoff abgedampft und der Rückstand mit dem Lösungsmittelstandard einer mittleren Konzentration versetzt. Die Peakflächenverhältnisse der 36 Proben von Analyt und internem Standard werden errechnet und mit dem Lösungsmittelstandards mittlerer Konzentration verglichen, der keine extrahierte

Leermatrix enthält. Die FDA gibt in ihrer Richtlinie nur an, dass Matrixeffekte während der Methodenvalidierung bestimmt werden sollen, aber es findet sich dazu weder eine Vorgehensweise noch definierte Grenzwerte. In der Vorschrift des *Journal of Chromatography B* wird der Begriff Matrixeffekte dagegen überhaupt nicht erwähnt. Dies liegt daran, dass bei massenspektrometrischen Methoden der unterschiedliche Einfluss der Matrix auf Analyt und internen Standard erst in den letzten Jahren größere Aufmerksamkeit erfahren hat und in neueren Richtlinien bisher noch nicht eingearbeitet wurde [109].

Matrixeffekte können auf unterschiedliche Weise bestimmt und vermieden werden [110-119]. Die praktikabelste und genaueste Variante stammt von Matuszewski [111], die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Bei der Verwendung des deuterierten Analyten als interner Standards, sollten theoretisch keine Unterschiede in den Peakflächenverhältnissen zwischen Matrix und Lösungsmittel feststellbar sein. Signalbeeinflussende Effekte wirken sich sowohl auf den deuterierten als auch auf den nicht deuterierten Analyten in gleicher Weise aus, weshalb deuterierte interne Standards den Strukturanaloga generell zu bevorzugen sind. Bei der Verwendung von Strukturanaloga als interne Standards, die nicht die gleiche Retentionszeit wie der Analyt besitzen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass sich unterschiedliche signalbeeinflussende Effekte auf den internen Standard ergeben, wesentlich größer und in diesem Fall kann der interne Standard den Matrixeffekt, der auf den Analyten wirkt, nicht immer kompensieren und es können auf diese Weise falsche Ergebnisse resultieren.

2.2.7 Stabilität

Da in den meisten Fällen biologische Proben nicht gleich extrahiert und quantifiziert, sondern erst im Gefrierschrank gesammelt werden, ist eine Untersuchung der Aufbewahrungsbedingungen auf die Analytkonzentration notwendig. Hierzu wird die Einfrier-Auftau- und die Langzeitstabilität mit mindestens einem niedrigen und einem hohen Standard bestimmt. Für die Einfrier-Auftau-Stabilität werden je 6 niedrige und hohe Standards in 6 verschiedenen Leermatrices hergestellt und bei den zu untersuchenden Lagerungsbedingungen gelagert. Am darauf folgenden Tag werden die Proben aufgetaut und anschließend wieder eingefroren. Der Einfrier-Auftau-Prozess wird insgesamt 3 Mal wiederholt und die Proben anschließend nach dem entsprechenden Extraktionsprotokoll extrahiert und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen.

Für die Bestimmung der Langzeitstabilität werden erneut je 6 niedrige und hohe Standards in 6 verschiedenen Leermatrices hergestellt und bei den zu untersuchenden Lagerungsbedingungen gelagert. Der Zeitraum, wie lange die Proben unter den Bedingungen gelagert werden müssen, ist nicht fest vorgeschrieben. Allerdings sollte dieser mindestens so lange sein, wie auch die zu analysierenden Proben bis zur endgültigen Messung gelagert werden. Am Ende dieses Zeitraums werden die Proben nach der entsprechenden Vorschrift extrahiert und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen.

Eine Bestimmung der Kurzzeitstabilität gibt Auskunft über die Stabilität der Proben am Tag der Extraktion. Dazu werden 6 niedrige und 6 hohe Standards in 6 verschiedenen Leermatrices hergestellt

und mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend werden die Proben extrahiert und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen.

Um eine chemische Instabilität oder Adsorptionseffekte an die Probengefäße während der Messung auszuschließen, wird zusätzlich die Probenstabilität nach Extraktion ermittelt. Dazu werden 6 verschiedene Leermatrizes mit einem hohen und einem niedrigen Standard dotiert und extrahiert. Die in Probensolvens aufgenommenen Proben werden anschließend im Autosampler unter den Messbedingungen gelagert und nach 24 Stunden gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen.

Wie die Stabilität der Proben muss auch die Stabilität von Stammlösungen gewährleistet sein. Dazu werden 6 Stammlösungen der Analyten und 6 Stammlösungen der internen Standards hergestellt und 6 Stunden bei Raumtemperatur und normalem Tageslicht gelagert. Anschließend wird der Gehalt dieser Stammlösungen gegen eine frisch hergestellte Standardreihe bestimmt.

3. Bestimmung von Prostaglandin E₂ und D₂ aus Mikrodialysaten von Ratten

3.1 Zielsetzung

Nach einem peripheren Schmerzreiz wird PGE₂ nicht nur lokal synthetisiert, wo es neben Bradykinin, Protonen und verschiedenen Neuropeptiden zu einer Sensibilisierung von Nozizeptoren führt, sondern auch im zentralen Nervensystem. Mikrodialyseexperimente von Ratten zeigten, dass infolge peripherer Schmerzstimulation die Konzentration von PGE₂ im Hinterhorn des Rückenmarks ansteigt und PGE₂ bei der Nozizeption im zentralen Nervensystem eine bedeutende Rolle spielt [1,86,120]. Über die Rolle von PGD₂ bei der Nozizeption ist dagegen bisher nichts bekannt.

In allen Mikrodialyseexperimenten wurde bisher die Konzentration von PGE₂ mit Hilfe von Immunoassays bestimmt. Dies setzt voraus, dass die auf Antikörper basierenden Immunoassays spezifisch für PGE₂ sind und alle anderen physiologisch vorkommenden und strukturverwandten Prostaglandine nicht erfassen. Die beiliegende Dokumentation der Immunoassays liefert über eventuelle Kreuzreaktionen nur wenige Informationen. Zwar sind die Kreuzreaktionen mit Primärmetaboliten des Cyclooxygenasewegs getestet worden, aber das mit PGE₂ strukturverwandte PGD₂ fehlt in dieser Liste (Tabelle 3-1).

Verbindung	Kreuzreaktion	Verbindung	Kreuzreaktion
PGE ₂	100 %	PGE ₁	70 %
PGE ₃	16,3 %	PGF _{1α}	1,4 %
PGF _{2α}	0,7 %	6-keto-PGF _{1α}	0,6 %
PGA ₂	0,1 %	PGB ₁	0,1 %
6,15-dihydro-13,14-dihydro-PGF _{1α}	< 0,1 %	13,14-dihydro-15-keto-PGF _{2α}	< 0,1 %
TXB ₂	< 0,1 %	2-Arachidonoylglycerol	< 0,1 %
Anandamid	< 0,1 %		

Tabelle 3-1: Kreuzreaktionen eines PGE₂-Immunoassays (entnommen aus der Dokumentation zum Prostaglandin E₂ *Enzyme Immuno Kit* von Assay Designs, Katalog-Nummer 900-001, Stand Februar 2003).

Um die Rolle der Prostaglandine im Rückenmark nach einem peripheren Schmerzreiz zu untersuchen, ist die Mikrodialyse ein etabliertes und anerkanntes Verfahren. Bei einer typischen Pumpgeschwindigkeit von 5 µl/min und 4 Datenpunkten pro Stunde (4 · 15 min) ergibt sich ein maximales Dialysatvolumen von 75 µl. Immunoassays benötigen aber ein Probenvolumen von 100 µl, und das Mikrodialysat muss deshalb vor der Quantifizierung verdünnt werden. Da für einen Immunoassay fast das ganze Probenvolumen eingesetzt wird, um in dessen Messbereich (wenige pg bis wenige ng) zu bleiben, ist es unmöglich aus einer Probe PGE₂ und PGD₂ zu bestimmen. In Vorexperimenten wurde PGD₂ mit

einem Immunoassay (PGD₂-MOX) in Mikrodialysaten von Ratten bestimmt, denen Formalin in die Hinterpfote injiziert wurde, allerdings wurde darin keine stabile Basislinie für PGD₂ beobachtet.

LC-MS/MS ist eine geeignete Methode, um die Nachteile der Immunoassays zu umgehen. Abhängig von den verwendeten Analyten können Sensitivitäten im fg-Bereich erreicht werden. Durch das Funktionsprinzip des Tandem-Massenspektrometers, das auf den unterschiedlichen Ausgangsmassen der Analyten und ihren spezifischen Fragmenten beruht, wird zudem eine hohe Selektivität erreicht und mehrere Prostaglandine können in einem einzigen Mikrodialysat bestimmt werden. Im Vergleich zu GC/MS und GC-MS/MS-Methoden ist für LC-MS/MS keine Derivatisierung der Prostaglandine nötig, wodurch die Probenaufbereitung wesentlich erleichtert wird. Aufgrund dieser Vorzüge sollte eine auf LC-MS/MS basierende Methode entwickelt werden, mit der PGE₂ und PGD₂ selektiv in Mikrodialysaten von Ratten bestimmt werden können.

Die niedrigsten Konzentrationen von PGE₂, die mit Immunoassays bestimmt worden sind, betragen etwa 40 pg/ml Dialysat [86]. Somit sollte eine Quantifizierungsgrenze der LC-MS/MS-Methode für PGE₂ von unter 40 pg/ml erreicht werden.

3.2 Methodenentwicklung

3.2.1 Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen

Optimale Einstellungen des Massenspektrometers sind Grundvoraussetzung für eine empfindliche LC-MS/MS-Methode. Da Tandem-Massenspektrometer zwei filternde Ionenoptiken besitzen, um Substanzen selektiv und vor allem sensitiv zu detektieren, müssen diese auf die jeweilige Substanz perfekt angepasst werden. Zur Optimierung werden die Substanzen in hoher Konzentration mit Hilfe einer Spritzenpumpe in das Gerät infundiert, um eine konstante Ionenzahl pro Zeiteinheit zu erzeugen. Um verschiedene Prostaglandine für das Massenspektrometer sichtbar zu machen, wurden diese auf der Anlage I (API 3000) mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 µl/min und einer Konzentration von 500 – 10.000 ng/ml in Methanol infundiert, so dass sich im Q₁-Scan eine Ionenintensität von ca. $1 \cdot 10^6$ cps des zu erwartenden Molekülpeaks ergab (Details im Anhang I). Aufgrund der funktionellen Säuregruppe zeigten sämtliche Prostaglandine nur im negativen Ionenmodus intensive Molekülpeaks [M-H].

Die Software des Massenspektrometers (Analyst Version 1.1) ist während des konstanten Ionenflusses in der Lage, sämtliche wichtigen Parameter des Massenspektrometers grob anzupassen. Die einzige Angabe, die die Software benötigt, ist die monoisotopische Masse des Prostaglandins. Anhand dieser Masse und des Ionenmodus wird der Molekülpeak identifiziert und sein Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z genau bestimmt. Um eine möglichst hohe Anzahl an Ionen in das Gerät zu fokussieren, werden anschließend *focusing-* (FP) und *declustering-potential* (DP) optimiert. Im dritten Schritt wird ein Fragmentspektrum des Molekülpeaks mit Hilfe eines Produkt-Ionen-Scans aufgenommen und die intensivsten Fragmente automatisch ausgewählt. Für jedes dieser Fragmente werden separat *collision energy* (CE) und *cell-exit-potential* (CXP) angepasst. Die erhaltenen Massenübergänge und die Poten-

tiale FP, DP, CE und CXP bilden anschließend die Basis für eine genauere manuelle Einstellung der Parameter, da die Analyst-Software nur eine relativ grobe Auflösung für die automatische Optimierung verwendet.

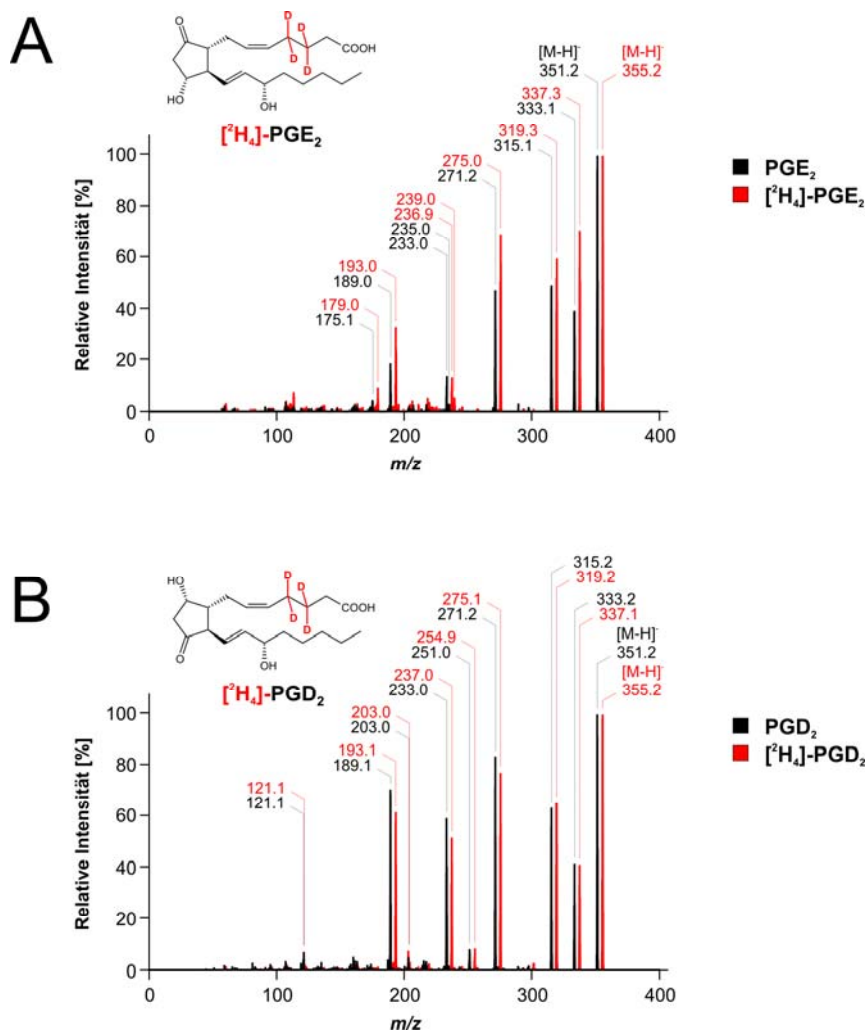


Abbildung 3-1: Massenspektren von PGE₂, [²H₄]-PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂. Die Produktionenscans wurden während der Tuning-Automatik der Analyst-Software im negativen Ionenmodus erhalten. Die Massenspektren der deuterierten Prostaglandine (rot) wurden den jeweiligen Produktionenscans von PGE₂ (A) bzw. PGD₂ (B) überlagert. Die verwendete Konzentration der vier Prostaglandine betrug jeweils 1000 ng/ml in Methanol. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 20 µl/min.

Die verschiedenen Massenfragmente der Prostaglandine resultieren aus der Elimination von Wasser, CO₂ und schrittweisem Abbau des Kohlenstoffskeletts. Die Interpretation sämtlicher aufgenommener Massenspektren würde den Rahmen der vorliegenden Arbeit sprengen, weshalb nur auf das Fragmentmuster von PGE₂ und [²H₄]-PGE₂ näher eingegangen werden soll. Da sich PGE₂ und [²H₄]-PGE₂ im Massenspektrometer gleich verhalten und sich nur in ihrer Masse unterscheiden, kann ein Strukturvorschlag für ein Fragment mit deuteriertem PGE₂ bestätigt oder ausgeschlossen werden. Die sanften Kollisionsbedingungen im API 3000 führen im Gegensatz zu anderen Fragmentierungsmechanismen

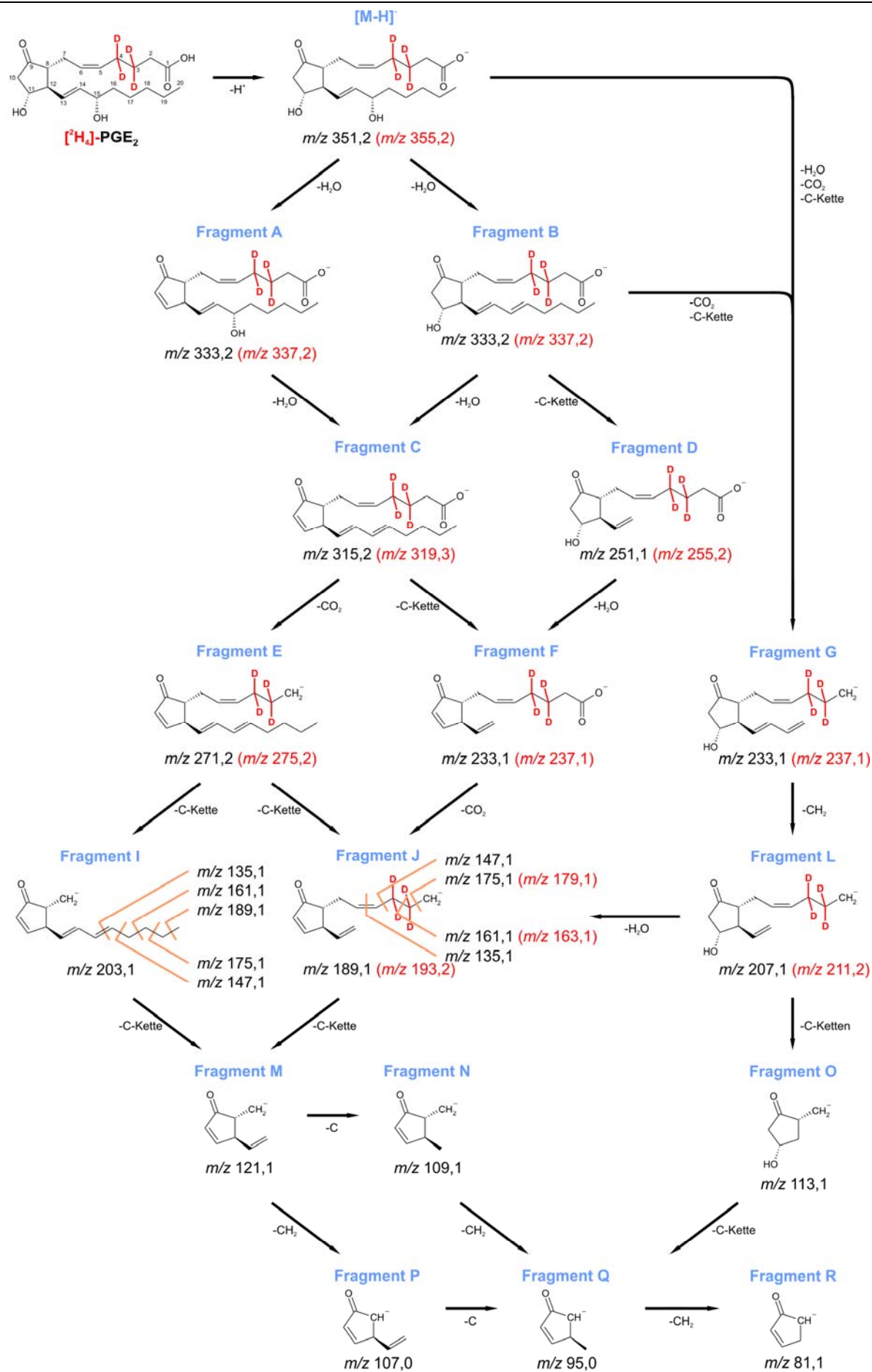
(z.B. *electron impact*) nur sehr selten zu mehrfach geladenen Fragmenten und m/z entspricht in diesem Fall der realen Masse der Fragmente. Alle folgenden Berechnungen wurden unter dieser Annahme durchgeführt.

Da PGE₂ im negativen Ionenmodus detektiert wird, berechnet sich der Molekülpeak aus der monoisotopischen Masse minus der Masse eines Protons (1,00794 amu). Anhand der Summenformel von PGE₂ (C₂₀H₃₂O₅) ergibt sich eine monoisotopische Masse von 352,2 amu und ein Molekülpeak [M-H]⁻ von 351,2 amu. Die monoisotopische Masse für deuteriertes PGE₂, [²H₄]-PGE₂, beträgt 356,2 amu und für den Molekülpeak [M-H]⁻ 355,2 amu.

PGE₂ zeigt neben dem Molekülpeak [M-H]⁻ bei m/z 351 im Fragmentspektrum fünf intensive Peaks bei m/z 189, m/z 233, m/z 271, m/z 315 und m/z 333 (Abbildung 3-1). Im Fragmentspektrum von deuteriertem PGE₂, [²H₄]-PGE₂, treten diese fünf Hauptpeaks ebenfalls auf und sind um vier Masseneinheiten schwerer als bei PGE₂. Sämtliche Strukturvorschläge der Hauptfragmente müssen somit die vier Deuteriumatome der Kohlenstoffatome C3 und C4 enthalten.

Die Differenz zwischen m/z 351 des Molekülpeaks [M-H]⁻ und dem ersten Fragment mit m/z 333 beträgt m/z 18 und entspricht dem Verlust von einem Molekül Wasser. PGE₂ enthält zwei Hydroxylgruppen an denen Wasser eliminiert werden kann (an C9 und C15) und beide Positionen führen zu konjugierten Doppelbindungssystemen (Fragment A und Fragment B), weshalb für das Fragment m/z 333 keine Aussage getroffen werden kann, welche Struktur energetisch bevorzugt wird. Wahrscheinlich wird das Signal m/z 333 sowohl von Fragment A als auch Fragment B verursacht (Abbildung 3-2). Anders sieht es dagegen beim Fragment m/z 315 aus. Die Differenz zum Molekülpeak ergibt eine Differenz von m/z 36, was der Elimination von zwei Wassermolekülen entspricht. Hierfür kommt nur die Elimination von beiden Hydroxylgruppen in Frage (Fragment C). Die Differenz des dritten Fragment m/z 271 zum Molekülpeak beträgt m/z 80. Hier stehen wesentlich mehr Möglichkeiten zur Auswahl. Betrachtet man allerdings Fragment C (Verlust von 2 Wassermolekülen) als Vorläufer, so beträgt die Differenz nur m/z 44, was einem Verlust von CO₂ entspricht. Das Fragment m/z 271 kommt demnach durch Elimination der beiden Hydroxylgruppen und der Carboxylfunktion zustande. Die Signale bei m/z 233 und m/z 189 können durch den Verlust einfacher funktioneller Gruppen nicht mehr erklärt werden und Veränderungen am Kohlenstoffskelett müssen bei diesen beiden Fragmente vorhanden sein. Unglücklicherweise kommen drei Strukturvorschläge für m/z 233 (Fragment F, G und H) und zwei für m/z 189 (Fragment J und K) in Frage, wovon keiner ausgeschlossen werden kann. Je kleiner die Masse des Fragments, umso mehr Möglichkeiten ergeben sich für Veränderungen am Kohlenstoffgerüst (Abbildung 3-3). Die verwendeten Vorschläge in Abbildung 3-3 sind somit nicht die einzig möglichen.

Ein mögliches Fragmentierungsschema für PGE₂ und [²H₄]-PGE₂ ist in Abbildung 3-2 wiedergegeben.

Abbildung 3-2: Mögliches Fragmentierungsschema von PGE₂ und [²H₄]-PGE₂ (rot).

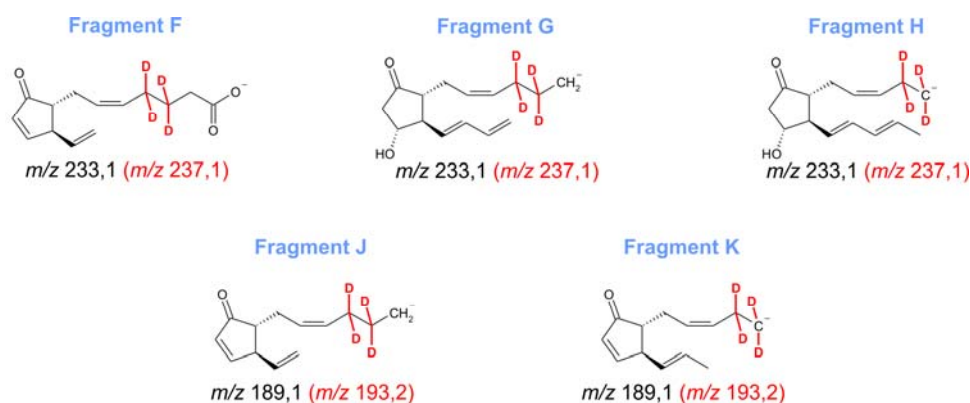


Abbildung 3-3: Mögliche Strukturvorschläge für Fragment m/z 233 und m/z 189 von PGE₂ bzw. [²H₄]-PGE₂

Einige Prostaglandine, wie zum Beispiel PGE₂, PGD₂, PGH₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGD₂, Δ^{12} -PGD₂ und Lipoxin A₄ besitzen die gleiche Summenformel (C₂₀H₃₂O₅) und dementsprechend auch die gleiche Molekularmasse von 352,5 amu. Im Tandem-Massenspektrometer könnten diese Substanzen trotzdem zur gleichen Zeit voneinander unterschieden werden, wenn in der Kollisionszelle aus jedem Prostaglandin spezifische Fragmente entstehen würden. Allerdings sind die Fragmentspektren von PGE₂, PGD₂, PGH₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGD₂ und Δ^{12} -PGD₂ fast identisch (siehe Anhang I) und eine Unterscheidung dieser Substanzen über die sensitiven Fragmente kann nur durch eine vorherige chromatographische Auftrennung erreicht werden. Sämtliche Massenspektren, zugehörige Massenübergänge und Spannungsparameter aller verwendeten Prostaglandine finden sich in Anhang I. Die zwei empfindlichsten Massenübergänge („Quantifier“ und „Qualifier“) je Prostaglandin wurden anschließend in einer einzigen MRM-Methode vereinigt. Insgesamt wurden so in der Methodenentwicklung zunächst 18 Eicosanoide und 9 interne Standards betrachtet (Tabelle 3-2).

Nr. Eicosanoid	Nr. Eicosanoid	Nr. Interner Standard
1 PGE ₂	10 TXB ₂	19 [² H ₄]-PGE ₂
2 PGD ₂	11 11-dehydro-TXB ₂	20 [² H ₄]-PGD ₂
3 6-keto-PGF _{1α}	12 PGJ ₂	21 [² H ₄]-6-keto-PGF _{1α}
4 PGF _{2α}	13 Δ^{12} -PGJ ₂	22 [² H ₄]-PGF _{2α}
5 PGG ₂	14 Δ^{12} -PGD ₂	23 [² H ₄]-TXB ₂
6 PGH ₂	15 15d-PGJ ₂	24 [² H ₄]-11-dehydro-TXB ₂
7 PGA ₂	16 15d-PGD ₂	25 [² H ₄]-15d-PGJ ₂
8 PGB ₂	17 13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂	26 [² H ₄]-PGA ₂
9 Lipoxin A ₄	18 13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂	27 [² H ₄]-PGB ₂

Tabelle 3-2: Verwendete Prostaglandine in der MRM-Methode. Die zugehörigen Massenübergänge und Spannungen sind in Anhang I zusammengefasst.

3.2.2 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Der Schwerpunkt wurde auf die chromatographische Trennung und maximale Sensitivität von PGE₂ und PGD₂ gelegt. Die beste Empfindlichkeit der beiden Prostaglandine zeigte sich mit Methanol-Wasser-Mischungen, doch war eine chromatographische Trennung von PGE₂ und PGD₂ mit verschiedensten *reversed-phase*-Materialien innerhalb von normalen LC-MS/MS-Analysenzeiten (< 20 min) nicht möglich. Auch der Zusatz von Ameisensäure, Ammoniak oder Ammoniumacetat brachte keine wesentliche Verbesserung. Nur Mischungen aus Acetonitril, Wasser und Ameisensäure waren in der Lage, PGE₂ und PGD₂ auf fast allen *reversed-phase*-Materialien zu trennen. Zwar konnte damit eine Auftrennung der beiden geforderten Prostaglandine erreicht werden, aber der Ameisensäurezusatz führte zu Einbußen in der Sensitivität von PGE₂ und PGD₂ (Abbildung 3-4).

Der Grund für den erheblichen Empfindlichkeitsverlust durch den Einsatz von Ameisensäure sind der verwendete Ionenmodus des Massenspektrometers und nachfolgende Reaktionen während der Elektrospraybildung. Da Prostaglandine als Carbonsäuren im negativen Ionenmodus detektiert werden, führt Ameisensäure zu einer Konkurrenzreaktion während des Ionisierungsprozesses. Durch den niedrigeren pK_s-Wert der Ameisensäure (3,77) wird diese leichter negativ ionisiert als Prostaglandine (pK_s ca. 4,5) und führt zu einer geringeren Ausbeute an ionisierten Prostaglandinen. Weitere signalabschwächende Reaktionen finden in der Gasphase statt: Nicht quantitativ ionisierte Ameisensäure kann im Elektrospray negativ geladene Prostaglandine protonieren, was zu einem weiteren Verlust an Prostaglandinionen führt.

Mit einer Nucleosil Nautilus (125 mm · 4 mm, Partikelgröße 3 µm, Porengröße 125 Å, Macherey-Nagel, Düren) war es zwar möglich, innerhalb von 12 Minuten PGE₂ und PGD₂ mittels eines Gradientensystems voneinander zu trennen aber das Quantifizierungslimit des Systems lag nur bei 2 ng/ml PGE₂ und weit über den zu erwartenden Werten von Mikrodialysaten. Auch der Nachfolger der Nucleosil-Nautilus, Pyramid, brachte keine Verbesserung der Sensitivität. Erst der Wechsel auf neue Materialien der Firma Phenomenex zeigte einen erheblichen Empfindlichkeitszuwachs. Die Materialien Synergi Hydro-RP und Synergi MAX-RP zeigten bei gleichen Säulendimensionen (150 mm · 2 mm, Partikelgröße 4 µm, Porengröße 80 Å, Phenomenex, Aschaffenburg) eine vergleichbare Sensitivität von etwa 400-500 pg/ml PGE₂. Als mobile Phase wurde Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (40:60:0,1, v/v, pH 2,8) mit einer Fließgeschwindigkeit von 500 µl/min verwendet. Für die chromatographische Trennung von PGE₂ und PGD₂ wurde allerdings die Synergi Hydro-RP aufgrund symmetrischerer Peaks bevorzugt. Um schnellere Analysenzeiten und bessere Empfindlichkeit zu erreichen, wurde ein linearer Gradient mit einer Fließgeschwindigkeit von 500 µl/min verwendet (Tabelle 3-3). Als Laufmittel A wurde eine Mischung von Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (40:60:0,1, v/v, pH 2,8) und als Laufmittel B Methanol verwendet. Prostaglandin-Standards wurden in Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (40:60:0,1, v/v, pH 2,8) angesetzt und davon 35 µl injiziert. PGE₂ zeigte eine Retentionszeit von 2,8 min und PGD₂ von 3,1 min. Die Gradientenelution brachte eine Empfindlichkeitssteigerung um den Faktor 2.

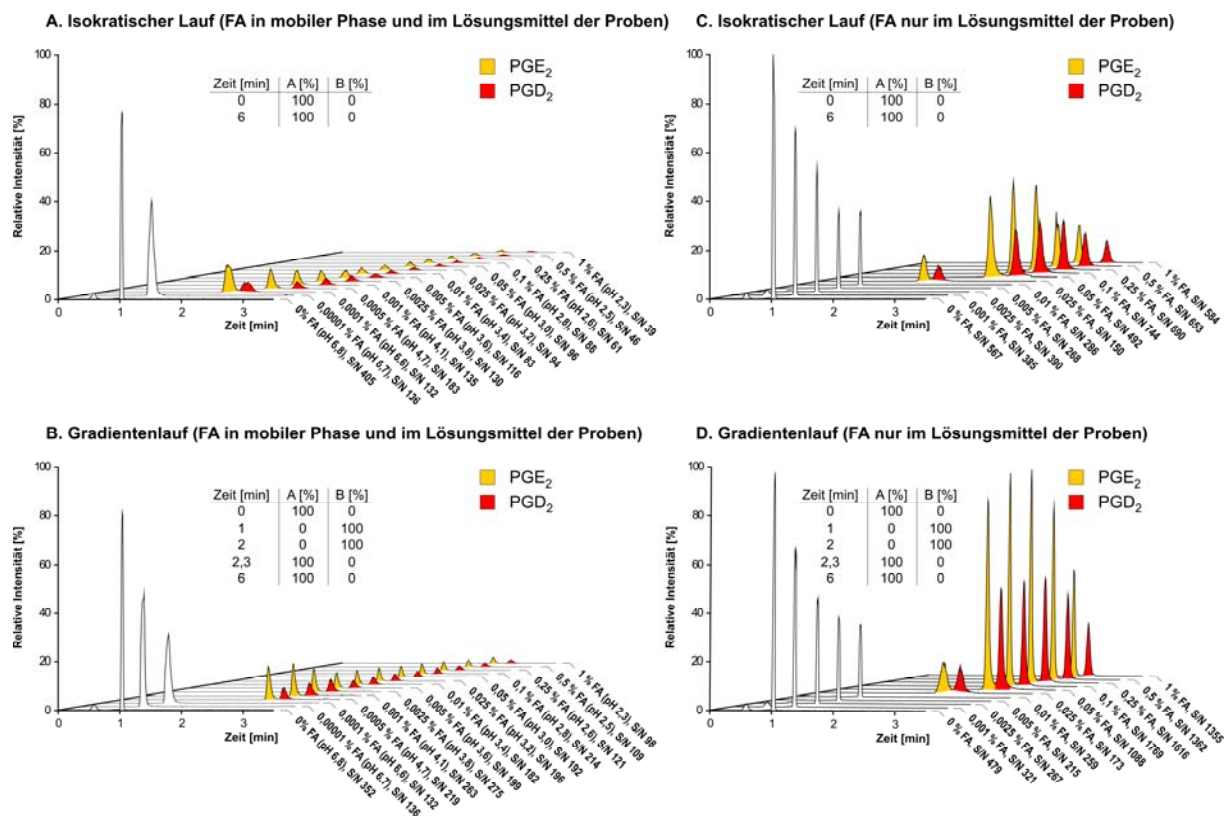


Abbildung 3-4: Vergleich von isokratischer Elution und Gradientenelution mit und ohne Ameisensäurezusatz zur mobilen Phase. Die Chromatogramme in A und B wurden durch Zusatz von Ameisensäure (FA) zur mobilen Phase und zum Probensolvens erhalten. Der pH-Wert wurde nach Ameisensäurezusatz in der mobilen Phase A gemessen (Acetonitril/Wasser/Ameisensäure, 40:60:Z-Achse, v/v). Mobile Phase B war Methanol/Ameisensäure (100:Z-Achse, v/v). Die Konzentration an PGE₂ und PGD₂ betrug 2,5 ng/ml in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:Z-Achse, v/v). In den Chromatogrammen in C und D wurde Ameisensäure nur dem Probensolvens zugefügt. Als mobile Phase A wurde Acetonitril/Wasser (40:60, v/v, pH 6,8) und als mobile Phase B Methanol verwendet. Die Konzentration an PGE₂ und PGD₂ betrug 2,5 ng/ml in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:Z-Achse, v/v). Die Chromatogramme in A und C wurden unter isokratischen Bedingungen aufgenommen (0 min: A 100%, B 100%; 6 min: A 100%, B 0%), die Chromatogramme in B und D dagegen unter Gradientenelution (0 min: A 100%, B 0%; 1 min: A 0%, B 100%; 2 min: A 0%, B 100%; 2,3 min: A 100%, B 0%; 6 min: A 100% B 0%). Als Trennsäule wurde die Synergi Hydro-RP (150 mm · 2 mm, 4 µm) eingesetzt. Die Flussrate betrug unter allen Bedingungen 500 µl/min und das Injektionsvolumen 35 µl. Das Signal-Rausch-Verhältnis (engl. *signal-to-noise*, S/N) wurde nur für PGE₂ angegeben. Als Massenübergang wurde m/z 351,2 → m/z 271,2 verwendet. Abkürzungen: FA = Ameisensäure, S/N = Signal-Rausch-Verhältnis.

Zeitpunkt	Mobile Phase A	Mobile Phase B
0 min	100%	0%
1 min	0%	100%
2 min	0%	100%
2,3 min	100%	0%
6 min	100%	0%

Tabelle 3-3: Gradientenzusammensetzung. Als mobile Phase A wurde Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (40:60:0,1, v/v, pH 2,8) und als mobile Phase B Methanol verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 500 µl/min.

Die Quantifizierungsgrenze dieser Methode betrug 200 pg/ml für PGE₂, aber die geforderte Empfindlichkeit von ca. 40 pg/ml konnte damit immer noch nicht erreicht werden. Erst nachdem Ameisensäure nicht mehr der mobilen Phase zugesetzt, aber noch im Lösungsmittel der Proben in einer Konzentration von 0,1 % beibehalten wurde (Abbildung 3-4), konnte die Empfindlichkeit des Systems auf 40 pg/ml für PGE₂ und 80 pg/ml für PGD₂ erhöht werden. Ein zusätzlicher Wechsel des Probensolvens von Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (40:60:0,1, v/v, pH 2,8) auf Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) brachte eine nochmalige Empfindlichkeitssteigerung. Mit der endgültigen Methode konnten somit 25 pg/ml PGE₂ und 50 pg/ml PGD₂ bestimmt werden. Durch den Verzicht auf Ameisensäure in der mobilen Phase verkürzten sich die Retentionszeiten geringfügig um 0,3 min auf 2,5 min für PGE₂ und 2,8 min für PGD₂.

Diese empfindliche Gradientenmethode brachte allerdings ein Problem hervor: Bei der nachfolgenden Validierung zeigte sich bei zahlreichen Proben ein Störpeak (Abbildung 3-5), der etwa 50 pg/ml PGE₂ entsprach. Zahlreiche Untersuchungen ergaben, dass die verwendeten Reaktionsgefäße (1,5 ml Safe Caps, Eppendorf) Ursache dieses Störpeaks waren. Sämtliche Reaktionsgefäße und vorsorglich auch Pipettenspitzen wurden daraufhin in Methanol gelegt und 15 min mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen entleert, mit frischem Methanol gewaschen und bei 80 °C getrocknet. Bei der anschließenden Validierung konnte kein Störpeak mehr festgestellt werden.

Wie in 3.2.1 bereits erwähnt wurde, gibt es außer PGD₂ noch weitere Prostaglandine, die die gleiche Summenformel wie PGE₂ und PGD₂ aufweisen. Darunter fallen PGH₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGE₂, 13,14-dihydro-15-keto-PGD₂, Δ^{12} -PGD₂ und Lipoxin A₄. Bis auf Lipoxin A₄ sind die Massenspektren der PGE₂- und PGD₂-Metabolite fast identisch (Anhang I) und eine mögliche Interferenz dieser Verbindungen mit dem Assay musste ausgeschlossen werden.

Eine Unterscheidung zwischen PGH₂ und PGE₂ ist mit dem entwickelten chromatographischen System nicht möglich, denn beide Verbindungen haben die gleiche Retentionszeit. Allerdings ist die Empfindlichkeit von PGH₂ (Produkt von Cayman) um den Faktor 1.000 gegenüber PGE₂ schwächer (0,1% Interferenz), so dass PGE₂-Konzentrationen in Mikrodialysaten nur durch extrem hohe PGH₂-Konzentrationen gestört werden (25-100 ng/ml PGH₂). Auf der einen Seite ist PGH₂ aufgrund seiner

Hydroperoxy-Struktur in wässrigen physiologischen Flüssigkeiten extrem instabil, so dass solch hohe PGH₂-Konzentration physiologisch unwahrscheinlich sind, und auf der anderen Seite wird das durch Cyclooxygenasen produzierte PGH₂ durch verschiedene Prostaglandin- und Thromboxan-Synthasen sofort zu PGE₂, PGD₂, PGI₂, PGF_{2α} und TXA₂ abgebaut. Die Interferenz von PGH₂ mit PGE₂ spielt somit keine Rolle.

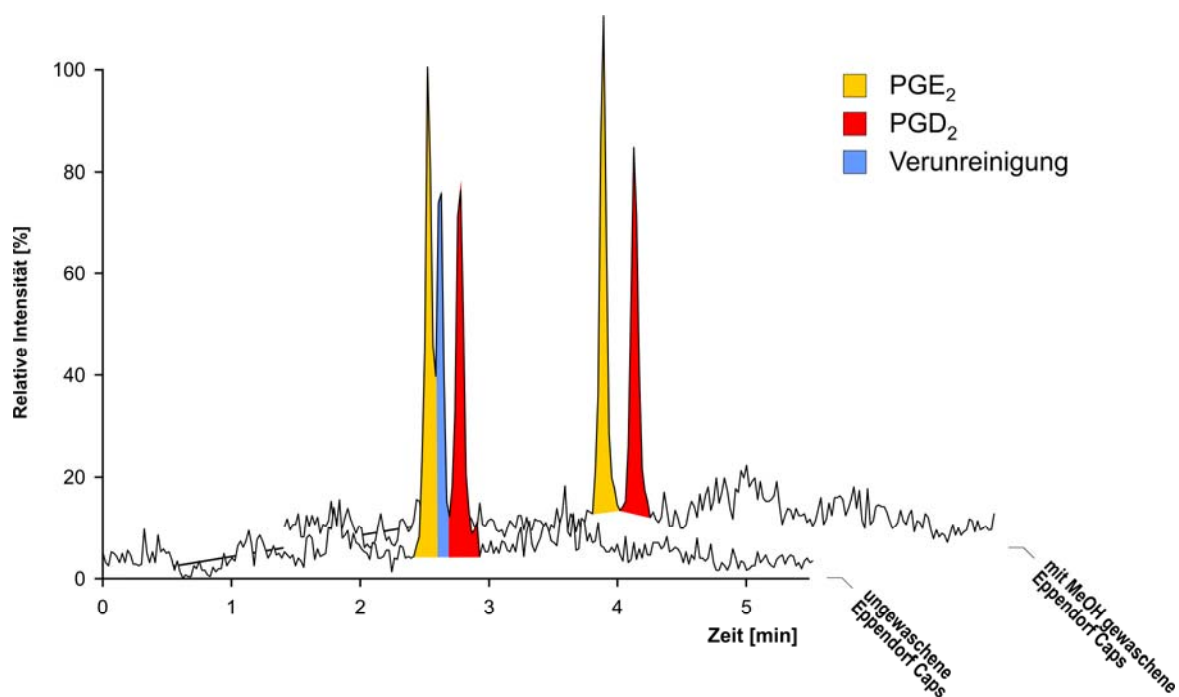


Abbildung 3-5: Verunreinigung von 1,5 ml Eppendorf Safe Caps. Beide Chromatogramme zeigen einen extrahierten 60 pg/ml Standard von PGE₂ und PGD₂. Die Verunreinigung von ungewaschenen Eppendorf Caps entspricht etwa 45 pg/ml PGE₂. Als Massenübergang wurde m/z 351,2 \rightarrow m/z 271,2 verwendet. Abkürzungen: MeOH = Methanol.

PGD₂ zeigt ebenfalls eine Interferenz mit Δ^{12} -PGD₂. Die Retentionszeiten beider Substanzen sind nahezu identisch und eine Injektion von gleichen Konzentrationen ergeben gleiche Peakhöhen (100% Interferenz). Δ^{12} -PGD₂ tritt als Zwischenprodukt bei der Albumin-katalysierten Umwandlung von PGD₂ in Δ^{12} -PGJ₂ auf [121], allerdings konnte bei Vorversuchen kein Δ^{12} -PGJ₂ in Mikrodialysaten detektiert werden.

Da PGJ₂ und Δ^{12} -PGJ₂ die gleiche Retentionszeit haben, ergibt sich eine weitere mögliche Interferenz mit PGE₂, nämlich Δ^{12} -PGE₂. Allerdings ist Δ^{12} -PGE₂ kommerziell nicht erhältlich und eine Interferenz mit PGE₂ konnte deshalb nicht bestimmt werden. In der Literatur gibt es zudem keine Hinweise auf eine Existenz von Δ^{12} -PGE₂ *in vivo*.

Obwohl mit PGH₂, Δ^{12} -PGD₂ und Δ^{12} -PGE₂ Interferenzen mit der Methode existieren, können diese bei der Bestimmung von Mikrodialysaten ausgeschlossen werden.

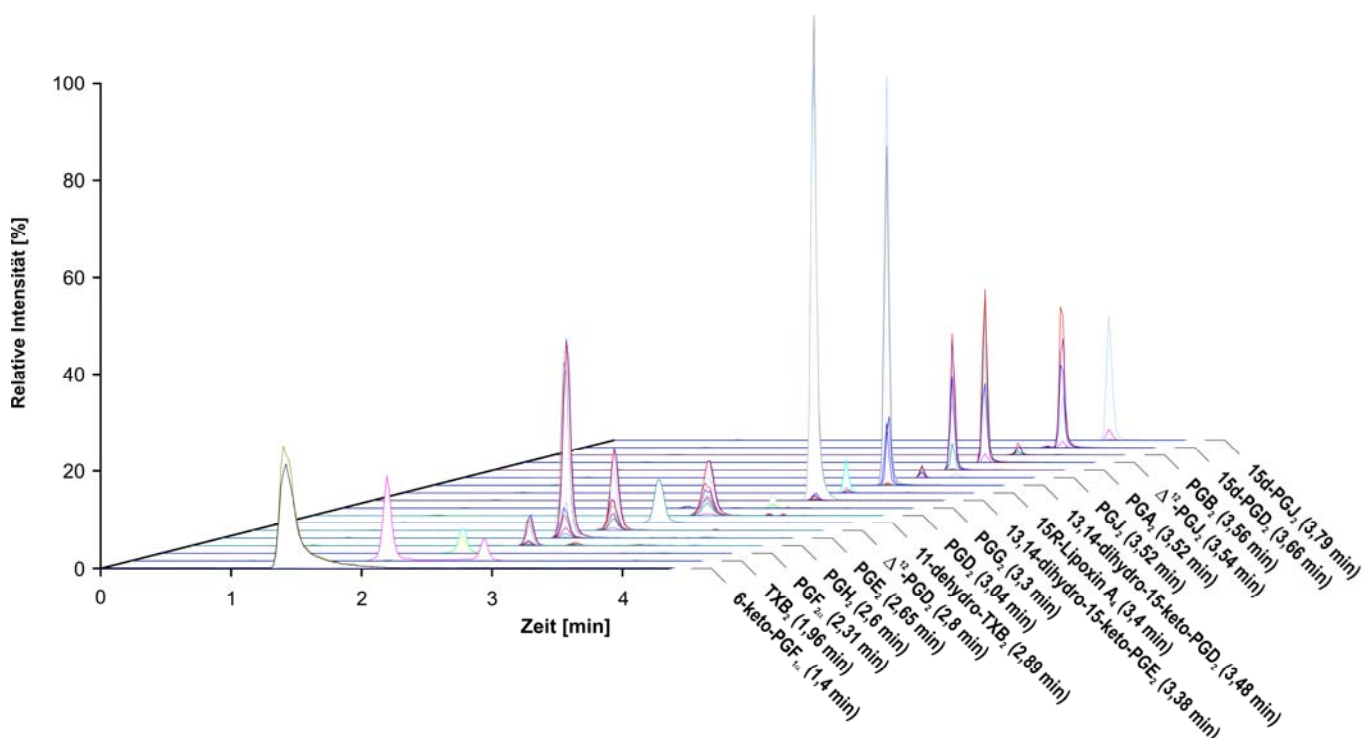


Abbildung 3-6: Mögliche Interferenzen der LC-MS/MS-Methode. Jede Substanz mit Ausnahme von PGH₂ wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) in Anlage I injiziert. PGH₂ wurde in einer Konzentration von 10.000 ng/ml in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 10 µl.

3.2.3 Optimierung der Aufarbeitung

Theoretisch ist es mit einer geeigneten Gradientenmethode möglich, kleine Volumina an salzhaltigen Lösungen (5 bis 10 µl) ohne weitere Aufarbeitung direkt in ein LC-MS/MS-System zu injizieren [122]. Um jedoch die geforderte Empfindlichkeit von unter 40 pg/ml PGE₂ zu erreichen, ist es notwendig fast die gesamte Probe für die Injektion zu verwenden. Eine Injektion von 50 µl ACSF-Lösung führt allerdings zu einer Akkumulation von Salzen im Interface des Massenspektrometers und zu einer deutlichen Signalsuppression, die bei mehreren Injektionen deutlich zunimmt. Somit ist die Präzision und Stabilität der Methode während einer Messreihe nicht gewährleistet.

Da die Matrix der Mikrodialysate nicht sehr kompliziert ist und nur wenige Proteine und Salze enthält, wurden verschiedene Lösungsmittel mit und ohne Ameisensäure-Zusatz ausprobiert, um die Prostaglandine mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus der ACSF-Lösung zu extrahieren. Dazu wurden Standards in ACSF angesetzt, die 5 ng/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂ enthielten. Zu 70 µl ACSF-Lösung wurden 20 µl Standardlösung (17,5 ng/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂ in Methanol) und 20 µl Methanol pipettiert und kurz geschüttelt. Anschließend wurden 400 µl

Extraktionsmittel zugegeben, 30 Sekunden geschüttelt und 2 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Die organische Phase wurde abgenommen und die wässrige Phase zwei weitere Male mit je 400 µl Extraktionsmittel ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt und bei 45 °C unter einem leichten Stickstoffstrom zur Trockne eingedampft. Anschließend wurden die Proben in 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und 35 µl in das LC-MS/MS-System (Gradientensystem, Tabelle 3-3) injiziert. Die Peakflächen der Analyten wurden mit einem Lösungsmittelstandard verglichen, was der absoluten Wiederfindung entspricht.

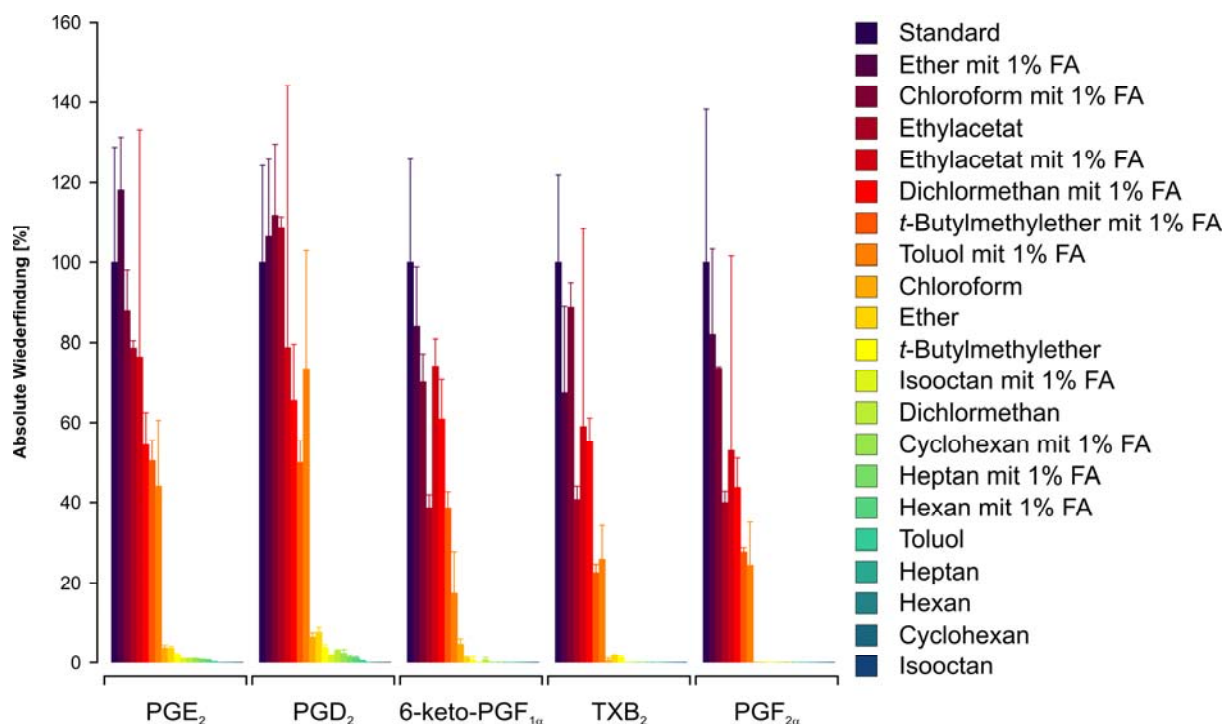


Abbildung 3-7: Absolute Wiederfindung von PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂ in extrahierten ACSF-Standards (effektiv 5 ng/ml). Die ACSF-Standards wurden 3 x mit je 400 µl Extraktionsmittel ausgeschüttelt. Dargestellt sind die Mittelwerte (μ) \pm Standardabweichung (SD) aus drei Extraktionen. Abkürzungen: FA = Ameisensäure.

Mit keinem der getesteten Extraktionsmitteln konnte eine absolute Wiederfindung von 100 % erreicht werden, weshalb für die weitere Optimierung nur die Lösungsmittel verwendet wurden, die eine absolute Wiederfindung von mindestens 50 % aufwiesen.

Im nächsten Schritt wurde die Isotopenreinheit der internen Standards [²H₄]-PGE₂, [²H₄]-PGD₂, [²H₄]-6-keto-PGF_{1α}, [²H₄]-PGF_{2α} und [²H₄]-TXB₂ überprüft. Dazu wurden die deuterierten internen Standards auf eine Konzentration von 1000 ng/ml mit Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) verdünnt und gegen eine Standardreihe von 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂ in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) gemessen. Die Isotopenreinheit von [²H₄]-PGE₂, [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und [²H₄]-PGF_{2α} betrugen 99,023 %, 98,879 % und

99,116 %, waren allerdings als interne Standards ungeeignet. Die Zugabe an internem Standard wird generell so kalkuliert, dass die Peakhöhe von extrahierten Proben mindestens 30.000 bis 40.000 cps beträgt oder der interne Standard wird in einer Konzentration zugegeben, die der Analytenkonzentration in den zu extrahierenden Proben entspricht. Dies ist notwendig, um seine Peakfläche sehr präzise und hinreichend genau bestimmen zu können. Bei einer Reinheit von nur 99 % ergeben sich so Peakhöhen der nicht deuterierten Substanz von etwa 300 bis 400 cps (Basislinie von 20 bis 50 cps). Die Konzentration müsste somit mindestens um den Faktor 10 gesenkt werden, um unterhalb die Basislinie zu gelangen. Die Reinheit von [²H₄]-PGD₂ und [²H₄]-TXB₂ betrugen 99,997 % und 99,967 % und waren als interne Standards geeignet.

Im nächsten Schritt wurden insgesamt sechs Standardreihen (10 bis 5000 pg/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂) nach dem vorherigen Schema angesetzt. Nur wurde diesmal anstatt 20 µl Methanol 20 µl interner Standard (10 ng/ml [²H₄]-PGD₂ und 30 ng/ml [²H₄]-TXB₂ in Methanol) zugegeben. Im Anschluss wurde je eine Standardreihe mit 3 x 400 µl Diethylether/Ameisensäure (100:1, v/v), Chloroform/Ameisensäure (100:1, v/v), Ethylacetat, Ethylacetat/Ameisensäure (100:1, v/v), Dichlormethan/Ameisensäure (100:1, v/v) oder *t*-Butylmethylether/Ameisensäure (100:1, v/v) extrahiert. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde der [²H₄]-PGD₂ als interner Standard für PGE₂ und PGD₂ und [²H₄]-TXB₂ für TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} eingesetzt. Zwar wurde die beste Empfindlichkeit (LLOQ 15-20 pg/ml PGE₂, 30-40 pg/ml PGD₂, 100-200 pg/ml 6-keto-PGF_{1α}, 100-200 pg/ml PGF_{2α}, 50-60 pg/ml TXB₂) mit Dichlormethan/Ameisensäure (100:1, v/v) erreicht, aber bei der späteren Validierung der Methode zeigte sich, dass Zusätze von Ameisensäure zum Extraktionsmittel zu unterschiedlichen Matrixeffekten führen, so dass auf die Extraktion mit Ethylacetat ohne Ameisensäure-Zusatz ausgewichen wurde. Die Empfindlichkeiten mit Ethylacetat waren nur geringfügig schlechter (LLOQ 25 pg/ml PGE₂, 50 pg/ml PGD₂, 200 pg/ml 6-keto-PGF_{1α}, 200 pg/ml PGF_{2α}, 80 pg/ml TXB₂).

Obwohl nach dem Nernst'schen-Verteilungsgesetz ein dreimaliges Ausschütteln mit 400 µl effektiver ist als ein einmaliges mit 1200 µl, zeigte sich kein Unterschied in der Wiederfindung von PGE₂ und PGD₂. Die Mikrodialysate wurden deswegen nur ein Mal mit 1200 µl Ethylacetat ausgeschüttelt.

3.2.4 Vorversuche

3.2.4.1 Mikrodialyse

Aufgrund der ausreichenden Empfindlichkeit für PGE₂ wurden die Mikrodialysate einer mit Formalin behandelten Ratte (Durchführung unter 3.4) nach 3.2.5 extrahiert und mit dem LC-MS/MS-System gegen eine frisch hergestellte Standardreihe bestimmt (25 bis 1000 pg/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ und Δ¹²-PGJ₂). Neben PGE₂ konnte PGD₂ detektiert werden; allerdings konnte mit der Methode kein 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ oder Δ¹²-PGJ₂ in den Mikrodialysaten beobachtet werden.

Als interner Standard für Δ^{12} -PGJ₂ wurde [²H₄]-PGD₂ verwendet. Die Methode wurde deswegen nur für PGE₂ und PGD₂ mit [²H₄]-PGD₂ als internem Standard validiert.

3.2.4.2 Optimierung der Massenübergänge von PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂

Für die sensitive Bestimmung von PGE₂ und PGD₂ kommen ihre fünf Hauptfragmente m/z 189, m/z 233, m/z 271, m/z 315 und m/z 333 in Frage. Obwohl sich ihre Fragmentspektren auf den ersten Blick nur durch die relativen Intensitäten der Hauptfragmente unterscheiden, finden sich Unterschiede bei den Spektren in den sehr schwachen Fragmenten m/z 175, m/z 203 m/z 235 und m/z 251 (Abbildung 3-1 und Anhang I). Die zwei Fragmente m/z 175 und m/z 235 scheinen selektiv für PGE₂ und m/z 203 und m/z 251 selektiv für PGD₂ zu sein.

Um den sensitivsten und selektivsten Übergang von PGE₂ und PGD₂ für die Methodenvalidierung auszuwählen, wurde eine Standardlösung von 2,5 ng/ml PGE₂ und 2,5 ng/ml PGD₂ in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) angesetzt und 35 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Für PGE₂ und PGD₂ liefert der Massenübergang m/z 351 → m/z 271 das höchste Signal-Rausch-Verhältnis (S/N) (Abbildung 3-8).

Von den vier selektiven Fragmenten ist zwar m/z 251 selektiv für PGD₂, aber keines 100 % selektiv für PGE₂. Zum anderen beträgt die Sensitivität dieses PGD₂-selektiven Fragments im Vergleich zu m/z 271 nur etwa 20%. Für die Methodenvalidierung wurde deshalb der Massenübergang m/z 351 → m/z 271 für die Quantifizierung von PGE₂ und PGD₂ ausgewählt und die vier selektiven Fragmente nicht weiter beachtet.

Nachdem als sensitivster Massenübergang m/z 351 → m/z 271 sowohl für PGE₂ als auch PGD₂ ausgewählt wurde, musste noch ein geeignetes Fragment für [²H₄]-PGD₂ gefunden werden. Als Kandidaten wurden m/z 237, m/z 275 und m/z 319 ausgewählt. Anschließend wurden 6 Standardreihen (50 pg/ml bis 1000 pg/ml PGE₂ und PGD₂) hergestellt und extrahiert: 70 µl ACSF wurden mit 20 µl Standard (87,5 pg/ml bis 3500 pg/ml PGE₂ und PGD₂ in Methanol) und 20 µl interner Standard (10 ng/ml [²H₄]-PGD₂ in Methanol) versetzt, mit 1200 µl Ethylacetat extrahiert und in 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und 35 µl in das LC-MS/MS-System (Gradientensystem, Tabelle 3-3) injiziert.

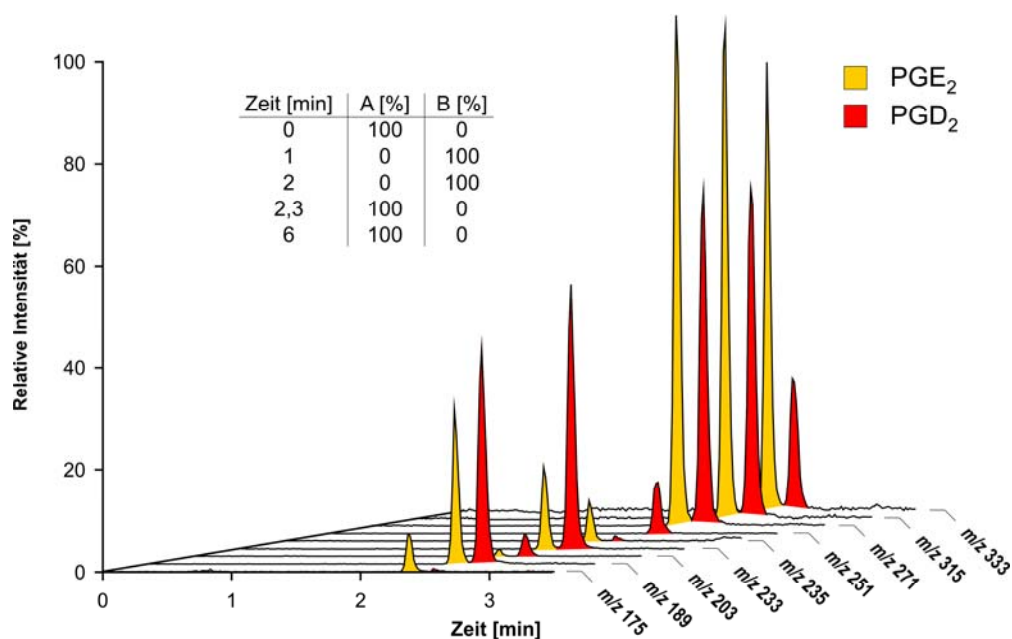


Abbildung 3-8: Sensitive und selektive Massenübergänge von PGE₂ und PGD₂. 35 µl einer 2,5 ng/ml PGE₂- und PGD₂-Lösung in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) wurden in das LC-MS/MS-System injiziert. Als mobile Phase A wurde Acetonitril/Wasser (40:60, v/v, pH 6,8) und als mobile Phase B Methanol verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 500 µl/min.

Für die Auswertung wurden die Peakflächen von PGE₂ und PGD₂ über den Massenübergang m/z 351 → m/z 271 und die Peakflächen des internen Standards über die drei Massenübergänge m/z 355 → 193, m/z 355 → m/z 237, m/z 355 → m/z 275 und m/z 355 → m/z 319 bestimmt. Anschließend wurden die Peakflächenverhältnisse von PGE₂ und PGD₂ mit allen drei Massenübergängen des internen Standards errechnet und daraus die Richtigkeit der sechs Standardreihen bestimmt (Tabelle 3-4).

Massenübergang		PGE ₂		PGD ₂	
M ₁	M ₂	$\mu \pm SD$	RSD	$\mu \pm SD$	RSD
m/z	m/z	(%)	(%)	(%)	(%)
355,2	→ 237,0	100,0 ± 5,8	5,8	100,0 ± 6,1	6,1
355,2	→ 275,1	100,0 ± 5,8	5,8	100,0 ± 6,2	6,2
355,2	→ 319,1	100,0 ± 6,0	6,0	99,9 ± 6,2	6,2

Tabelle 3-4: Richtigkeit von sechs extrahierten Standardreihen ausgewertet mit drei verschiedenen Massenübergängen des internen Standards [²H₄]-PGD₂. Abkürzungen: μ = Mittelwert, SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung.

Die Unterschiede bei der Auswertung sind nur sehr gering. Die beste Richtigkeit sowohl für PGE₂ als auch für PGD₂ wird mit dem Fragment m/z 237 erreicht. In der Methodenvalidierung wurde deshalb der Massenübergang m/z 355 → m/z 237 für die Bestimmung des internen Standards, [²H₄]-PGD₂, verwendet.

3.2.4.3 Stabilität

Für die Voruntersuchung zur Stabilität wurden Kalibrationsstandards mit 50 und 1000 pg/ml in ACSF angesetzt und deren Stabilität bei -20°C und -80°C untersucht. Für Stabilität wurden die Proben 1 Woche lang bei der entsprechenden Temperatur gelagert. Während der Bestimmung der Einfrier-Auftau- und Stabilität über 1 Woche wurde bei den Proben, die bei -80°C gelagert wurden, Verluste von 15 bis 20 % und bei den Proben, die bei -20°C gelagert wurden, Verluste von 20 bis 25 % an PGE₂ und PGD₂ festgestellt.

Um die Stabilitäten zu erhöhen, wurden erneut Kalibrationsstandards mit 50 und 1000 pg/ml in ACSF angesetzt, aber diesmal sofort mit Ethylacetat extrahiert. Nach dem Abdampfen der organischen Phase wurde die eine Hälfte der Proben unter Stickstoffatmosphäre und die andere Hälfte der Proben unter normaler Luft bei -80°C eingefroren. Bei den Proben, die unter Stickstoffatmosphäre gelagert wurden, betrugen die Verluste bei der Bestimmung der Einfrier-Auftau- und Stabilität über 1 Woche von PGE₂ und PGD₂ < 10% und waren geringer als die unter Luft aufbewahrten Proben (~ 15%).

3.2.5 Ergebnisse der Optimierung

3.2.5.1 LC-MS/MS-Einstellungen Anlage I (API 3000)

Die Bestimmung von PGE₂ und PGD₂ wurde auf Anlage I (API 3000) mit einer Synergi Hydro-RP-Säule (150 mm · 2 mm I.D., 4 µm Partikelgröße und 80 Å Porengröße) und einer Aqua-C₁₈-Vorsäule (4 mm · 2 mm I.D., 10 µm Partikelgröße und 125 Å Porengröße) durchgeführt. Als mobile Phase A wurde Acetonitril/Wasser (40:60, v/v, pH 6,8) und Methanol als mobile Phase B eingesetzt. Beide mobilen Phasen wurden vor der Verwendung unter Vakuum und Ultraschall entgast. Die Fließgeschwindigkeit betrug während der gesamten Analyse 500 µl/min. Direkt nach der Injektion (t = 0 min) von 35 µl Probe wurde innerhalb von einer Minute der Gradient von 100 % mobile Phase A auf 100 % mobile Phase B gewechselt (t = 1 min) und eine Minute lang gehalten (t = 2 min). Innerhalb von 0,3 min wurde der Gradient wieder auf 100 % mobile Phase A zurückgefahren (t = 2,3 min) und die Säule unter diesen Bedingungen die nächsten 3,7 Minuten equilibriert (t = 6 min). Als Probensolvens wurde Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) verwendet. Die Retentionszeiten betrugen 2,5 min für PGE₂ und 2,8 min für PGD₂. Für die HPLC und für das Probensolvens wurde Wasser, Acetonitril und Methanol von der Firma J.T.Baker in HPLC-Qualität verwendet.

Das Tandem-Massenspektrometer (API 3000) wurde mit der TurboIonSpray-Quelle im negativen Ionenmodus verwendet. Die Temperatur der Quelle wurde mit Hilfe eines Gas-Flusses von 8,0 l/min (*auxiliary gas*) auf 550°C eingestellt und an der Elektrospray-Nadel eine Spannung von -3400 V angelegt. Die Zerstäubergasgeschwindigkeit (*nebulizer gas*) betrug 1,58 l/min und die Gasvorhangsgeschwindigkeit (*curtain gas*) 1,25 l/min. Die Kollisionszelle enthielt $2,28 \cdot 10^{15}$ Moleküle N₂/cm². Sämtliche Quadrupole arbeiteten unter „unit“ Einstellung und im MRM-Modus. Für die Bestimmung von PGE₂ und PGD₂ diente der Massenübergang m/z 351,2 → m/z 271,2 und als Kontrolle der Massenübergang m/z 351,2 → m/z 315,2 (Details in Tabelle 3-5). Für die Detektion des internen Stan-

dards, [²H₄]-PGD₂, wurde der Massenübergang m/z 355,2 → m/z 237,0 und als Kontrollübergang m/z 355,2 → m/z 275,2 verwendet. Jede Ionenspur wurde pro MRM-Zyklus 200 ms lang betrachtet.

Die Orientierung der ESI-Quelle betrug +5 Einheiten in x-Richtung (parallel der Ionenflugbahn) und +4 Einheiten in y-Richtung (rechtwinklig zur Ionenflugbahn).

Analyt	M ₁ <i>m/z</i>	M ₂ <i>m/z</i>	t [ms]	DP [V]	FP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]	verwendeter IS
PGE ₂ / PGD ₂	351,2	→ 271,2	200	-45	-185	-10	-24	-2	[² H ₄]-PGD ₂
	351,2	→ 315,2	200	-45	-185	-10	-17	-1	
[² H ₄]-PGD ₂	355,2	→ 237,0	200	-31	-220	-10	-18	-5	
	355,2	→ 275,2	200	-31	-220	-10	-24	-15	

Tabelle 3-5: Massenübergänge und zugehörige Spannungen der MRM-Methode. Abkürzungen: M₁ = m/z der Verbindung, M₂ = m/z des Fragments, DP = *declustering potential*, FP = *focusing potential*, EP = *entrance potential*, CE = *collision energy*, CXP = *cell exit potential*, IS = Interner Standard.

3.2.5.2 Probenvorbereitung

PGE₂ und PGD₂ wurden als methanolische Lösungen mit einer Konzentration von 500.000 ng/ml bei -80°C gelagert. Aus diesen wurde eine methanolische Stammlösung I mit 10.000 ng/ml PGE₂ und 10.000 ng/ml PGD₂ hergestellt. Für die Herstellung der Standardreihen wurden 10 µl der Stammlösung I mit 990 µl Methanol versetzt (100 ng/ml PGE₂ und PGD₂). Durch weitere Verdünnung mit Methanol wurden Standards von 87,5 bis 3500 pg/ml nach dem Pipettierschema in Tabelle 3-6 hergestellt.

Der interne Standard, [²H₄]-PGD₂, wurde als methanolische Lösung mit einer Konzentration von 100.000 ng/ml bei -80°C aufbewahrt. Aus dieser wurde eine methanolische Stammlösung II mit 1.000 ng/ml [²H₄]-PGD₂ hergestellt. 40 µl der Stammlösung II wurden mit 3960 µl Methanol zu 10 ng/ml [²H₄]-PGD₂ in Methanol verdünnt. Da 20 µl dieser Lösung zu Proben und Kalibrationsstandards pipettiert und nach dem Abdampfen der Ethylacetatphase in einem Endvolumen von 50 µl aufgenommen werden, entspricht die Endkonzentration des internen Standards 4 ng/ml in extrahierten Mikrodialysaten.

Sämtliche Stamm- und Standardlösungen wurden in Glasgefäßen aufbewahrt und bei -80°C gelagert. Kalibrationsstandards und Qualitätsstandards wurden mit 70 µl ACSF, 20 µl Standard (87,5 bis 3500 pg/ml in Methanol) und 20 µl internem Standard [²H₄]-PGD₂ (10 ng/ml in Methanol) hergestellt, um eine Standardreihe von 25 bis 1000 pg/ml zu erhalten. 70 µl Mikrodialysat von Ratten wurden mit 20 µl Methanol und 20 µl internem Standard [²H₄]-PGD₂ (10 ng/ml in Methanol) versetzt. Als Reaktionsgefäße dienten mit Methanol gewaschene Eppendorf Safe Caps. Sämtliche Proben wurden anschließend ca. 2 s geschüttelt. Um die Prostaglandine zu extrahieren, wurden die Proben mit 1200 µl Ethylacetat versetzt, 30 s geschüttelt und 2 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die obere Ethylacetatphase wur-

de abgenommen und bei 45°C unter leichter Stickstoffzufuhr bis zur Trockne eingengt. Die Proben wurden anschließend mit 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) versetzt, 20 s geschüttelt, 2 min bei 10.000 g zentrifugiert und in Glasfläschchen mit 200 µl Mikroinserten (Macherey-Nagel, Düren) umgefüllt. 35 µl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert.

Sofern die Proben nicht direkt nach der Extraktion gemessen werden konnten, wurden sie unter Stickstoffatmosphäre bei -80°C eingefroren.

Nr.	End-Konzentration [pg/ml]	effektive Konzentration [pg/ml]	Volumen der Stammlösung [µl]	Konzentration der Stammlösung [pg/ml]	Volumen Methanol [µl]
11	1.000	3.500	56	100.000	1.544
10	600	2.100	744	1.000	496
9	300	1.050	738	600	738
8	200	700	976	300	488
7	100	350	964	200	964
6	80	280	1.428	100	357
5	60	210	1.284	80	428
4	50	175	1.210	60	242
3	40	140	952	50	238
2	30	105	690	40	230
1	25	87,5	420	30	84

Tabelle 3-6: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe von PGE₂ und PGD₂. Da 20 µl Standard zu 70 µl ACSF-Lösung pipettiert werden sollen, muss die effektive Konzentration um den Faktor 3,5 höher sein als die angestrebte End-Konzentration in den ACSF-Standards.

3.2.5.3 Datenauswertung

Die Quantifizierung der Mikrodialysate erfolgte anhand einer frisch extrahierten Standardreihe. Für die Berechnung der Regression wurde für jeden Analyten das Verhältnis aus seiner Peakfläche und der Peakfläche des internen Standards ermittelt und gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Zur Berechnung der Kalibrationsgerade wurde eine quadratische Regressionsanalyse mit einer Gewichtung von $1/\text{Konzentration}^2$ verwendet.

3.3 Methodenvalidierung

Weil Prostaglandine permanent im Rückenmark der Ratte produziert werden, ist es nicht möglich Prostaglandin-freie Mikrodialysate zu sammeln und für die Methodenvalidierung zu verwenden. Als Matrix für die Validierung wurde deshalb ACSF ausgewählt, da diese der Zusammensetzung der Mikrodialysate am nächsten kommt.

3.3.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde mit sechs Standardreihen (25 pg/ml bis 1000 pg/ml) ermittelt, die nach 3.2.5 hergestellt und extrahiert wurden. Für alle Berechnungen wurden die Verhältnisse der Peakflächen der beiden Analyten (PGE₂ und PGD₂) und der Peakfläche des internen Standards, [²H₄]-PGD₂, bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Anschließend wurde für jede Konzentration der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (*SD*) und die relative Standardabweichung (*RSD*) berechnet. Die Richtigkeit der Methode für PGE₂ betrug 99,9 % \pm 6,1 % im Bereich zwischen 25 pg/ml und 1000 pg/ml und 100,0 % \pm 5,7 % für PGD₂ im Bereich zwischen 50 pg/ml und 1000 pg/ml. Der beste Wert für die Richtigkeit wurde mit einer gewichteten quadratischen Regression und einem Wichtungsfaktor von 1/Konzentration² erhalten. Die genauen Werte für jede Konzentration sind in Tabelle 3-7 wiedergegeben.

Richtigkeit Konzentration (pg/ml)	PGE ₂			PGD ₂		
	Richtigkeit \pm <i>SD</i> (n = 6)		<i>RSD</i>	Richtigkeit \pm <i>SD</i> (n = 6)		<i>RSD</i>
	(pg/ml)	(%)	(%)	(pg/ml)	(%)	(%)
25	25,1 \pm 1,1	100,2 \pm 4,3	4,3	28,4 \pm 7,8	113,6 \pm 31,2	27,4
30	30,2 \pm 2,1	100,6 \pm 7,0	7,0	29,9 \pm 3,4	99,5 \pm 11,2	11,3
40	38,4 \pm 2,6	96,0 \pm 6,6	6,9	41,4 \pm 6,4	103,4 \pm 15,9	15,7
50	50,7 \pm 3,6	101,4 \pm 7,2	7,1	49,6 \pm 3,1	99,1 \pm 6,2	6,3
60	62,2 \pm 5,7	103,6 \pm 9,5	9,2	61,6 \pm 4,9	102,6 \pm 8,1	7,9
80	78,2 \pm 2,3	97,7 \pm 2,9	3,0	79,4 \pm 7,4	99,2 \pm 9,2	9,3
100	100,1 \pm 5,8	100,1 \pm 5,8	5,8	98,3 \pm 7,3	98,3 \pm 7,3	7,4
200	194,4 \pm 12,2	97,2 \pm 6,1	6,3	196,0 \pm 4,4	98,0 \pm 2,2	2,2
300	305,4 \pm 17,7	101,8 \pm 5,9	5,8	313,8 \pm 18,3	104,6 \pm 6,1	5,8
600	604,8 \pm 52,2	100,8 \pm 8,7	8,7	585,0 \pm 22,8	97,5 \pm 3,8	3,9
1000	996,0 \pm 32,0	99,6 \pm 3,2	3,2	1007,0 \pm 16,0	100,7 \pm 1,6	1,6
μ		99,9 \pm 6,1	2,1		100,0 \pm 5,6	5,6

Tabelle 3-7: Zusammenfassung der Richtigkeit von PGE₂ und PGD₂ von extrahierten ACSF-Standards. Die Richtigkeit wurde mit 6 Standardreihen bestimmt, die nach 3.2.5 mit Ethylacetat extrahiert wurden. Blind- und Doppelblindproben enthielten kein PGE₂ bzw. PGD₂. Abkürzungen: μ = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung, *RSD* = relative Standardabweichung.

3.3.2 Selektivität und Spezifität

Die Bestimmung der Selektivität wurde gleichzeitig mit der Ermittlung der Richtigkeit durchgeführt. Sämtliche sechs Doppelblind- und Blindproben zeigten keine Störpeaks bei den zu erwartenden Retentionszeiten von PGE₂, PGD₂ und dem internen Standard, [²H₄]-PGD₂. Die Spezifität der Methode wurde schon unter 3.2.2. behandelt.

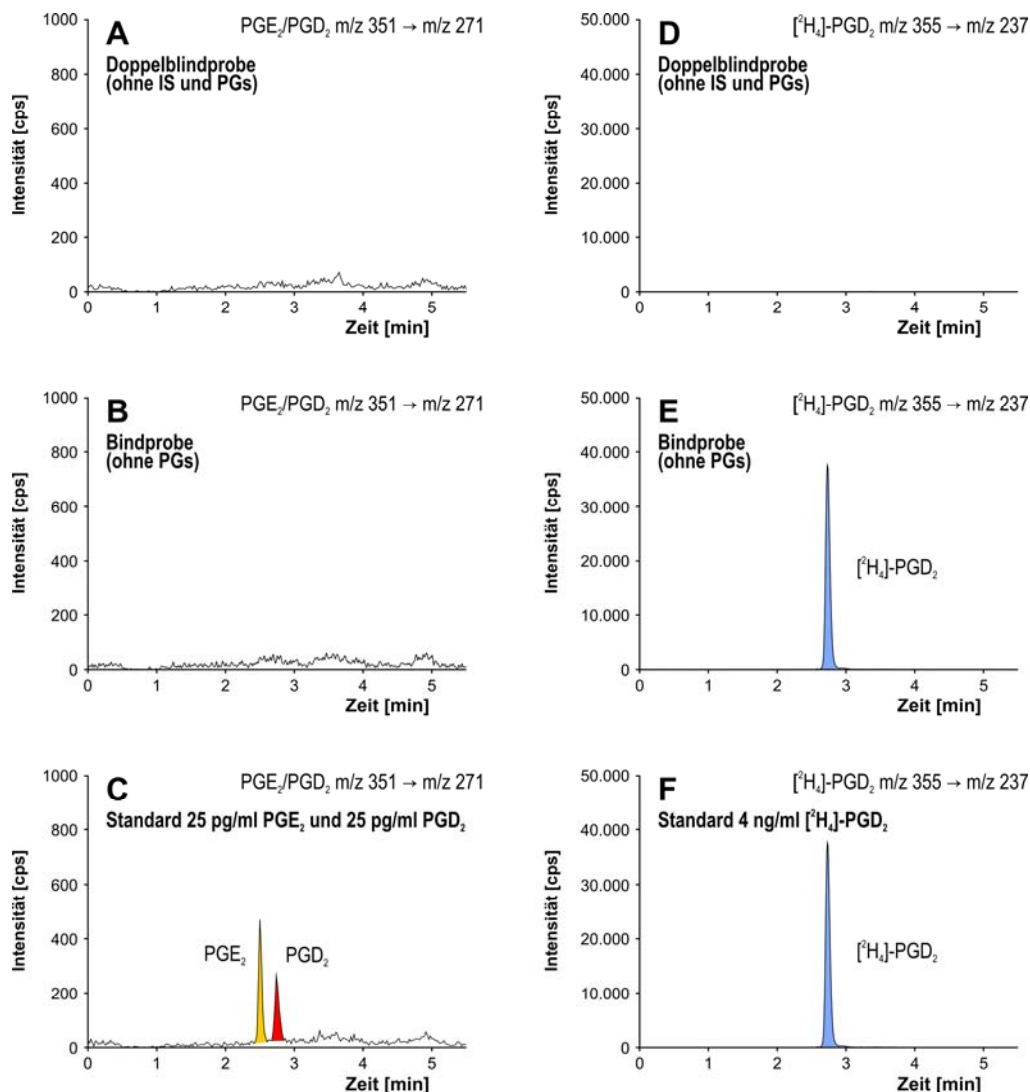


Abbildung 3-9: Selektivität der LC-MS/MS-Methode für extrahierte ACSF-Kalibrationsstandards. Chromatogramm A zeigt eine extrahierte Doppelblind-Probe für den Massenübergang m/z 351 → m/z 271 (PGE₂ und PGD₂). Der Massenübergang m/z 355 → m/z 237 für den internen Standard, [²H₄]-PGD₂, der Doppelblind-Probe ist im Chromatogramm D wiedergegeben. Die Chromatogramme B und E (Blindprobe) repräsentieren eine extrahierte ACSF Lösung, die mit 10 ng/ml internem Standard, [²H₄]-PGD₂, versetzt wurde (Endkonzentration 4 ng/ml). Die Chromatogramme C und F zeigen einen extrahierten ACSF-Standard und entsprechen 25 pg/ml PGE₂ und PGD₂ in den Mikrodialysaten (Endkonzentration je 35 pg/ml PGE₂ und PGD₂). Die Endkonzentration des internen Standards, [²H₄]-PGD₂, in den Chromatogrammen C und F beträgt 4 ng/ml. Abkürzungen: IS = Interner Standard, [²H₄]-PGD₂; PGs = PGE₂ und PGD₂.

3.3.3 Präzision

Die Methodenpräzision wurde an vier verschiedenen Tagen mit jeweils 5 Konzentrationen (25, 50, 100, 300 und 1000 pg/ml), Blind- und Doppelblindproben durchgeführt. Die Blindproben wurden nur mit internem Standard und ACSF-Matrix hergestellt und Doppelblindproben bestanden nur aus ACSF-Matrix. Da aufgrund des hohen Injektionsvolumens von 35 µl nur eine Messung pro extrahierter Probe durchgeführt werden konnte, wurde jede Konzentration, Blind- und Doppelblindprobe 24 mal nach 3.2.5 angesetzt und extrahiert. Nach dem Abdampfen des Ethylacetats wurde der Rückstand mit je 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) versetzt und nach Zentrifugation zu einer einzigen Probe vereinigt (1200 µl pro Konzentration, Blind- oder Doppelblindprobe). Jede vereinigte Probe wurde 18 Mal hintereinander in das LC-MS/MS-System injiziert und die Konzentration von PGE₂ und PGD₂ bestimmt. Zur Berechnung der Standardreihe wurden die Peakflächenverhältnisse von PGE₂ bzw. PGD₂ zum internen Standard, [²H₄]-PGD₂, jeder injizierten Probe verwendet. Anschließend wurde für jeden Tag der Mittelwert, die Standardabweichung und die relative Standardabweichung der Peakflächenverhältnisse für jede Konzentration, Blind- und Doppelblindprobe errechnet (Tabelle 3-8). Weder in den Blind- noch in den Doppelblindproben wurden Störpeaks bei den zu erwartenden Retentionszeiten von PGE₂, PGD₂ bzw. [²H₄]-PGD₂ beobachtet.

Analyt	Konzentration (pg/ml)	Intraday		Interday	
		$\mu \pm SD$ (%, n = 18)	RSD (%)	$\mu \pm SD$ (%, n = 18)	RSD (%)
PGE ₂	25	100,2 ± 14,0	13,9	99,6 ± 13,0	13,1
	50	97,5 ± 6,7	6,8	100,2 ± 9,0	9,0
	100	103,5 ± 7,7	7,4	100,7 ± 8,4	8,3
	300	97,6 ± 5,5	5,7	99,5 ± 5,8	5,8
	1000	100,4 ± 3,3	3,3	100,1 ± 4,6	4,6
	μ	99,8 ± 7,4	7,4	100,0 ± 8,2	8,2
PGD ₂	25	104,8 ± 14,6	14,0	102,4 ± 17,3	17,0
	50	100,6 ± 11,8	11,7	99,4 ± 9,0	9,1
	100	106,6 ± 8,3	7,8	103,2 ± 9,4	9,1
	300	96,9 ± 4,2	4,3	99,7 ± 7,0	7,0
	1000	100,5 ± 4,0	4,0	99,9 ± 4,3	4,3
	μ	101,9 ± 8,6	8,4	100,9 ± 9,4	9,3

Tabelle 3-8: Ergebnisse von Intraday- und Interday-Präzision für PGE₂ und PGD₂ aus ACSF-Standards. Die Endkonzentration von [²H₄]-PGD₂ betrug in allen Versuchen 4 ng/ml. Abkürzungen: μ = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung, *RSD* = relative Standardabweichung.

Als Quantifizierungsgrenze der Methode wurde die Konzentration des Analyten festgelegt, wo die Standardabweichung der Richtigkeit und die relative Standardabweichung der Methodenpräzision nicht mehr als 15 % betragen (85 % bis 115 %). Für PGE₂ ergab sich somit eine Quantifizierungsgrenze von 25 pg/ml (1,2 pg auf der Säule) und für PGD₂ von 50 pg/ml (2,5 pg auf der Säule).

3.3.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung von PGE₂ und PGD₂ wurde mit vier verschiedenen Konzentrationen (50, 100, 300 und 1000 pg/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde sechs Mal nach 3.2.5 angesetzt und extrahiert (Ansatz A). Die Endkonzentration des internen Standards betrug in allen Ansätzen jeweils 4 ng/ml. Zusätzlich wurden pro Konzentration 6 Doppelblindproben nach 3.2.5. hergestellt und extrahiert und nach dem Abdampfen des Ethylacetats in je 50 µl Lösungsmittel-Standards in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen (Ansatz B, nach dem Abdampfen dotiert), die die gleiche Stoffmenge an PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ enthielten wie die extrahierten Standards unter Ansatz A.

Analyt	Konzentration (pg/ml)	Relative Wiederfindung	Absolute Wiederfindung
		$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE ₂	50	85,9 ± 6,3	81,7 ± 8,1
	100	82,5 ± 9,7	81,8 ± 5,4
	300	80,0 ± 2,2	78,9 ± 4,1
	1000	82,0 ± 1,1	81,0 ± 1,6
	μ	82,6 ± 4,8	80,9 ± 4,8
PGD ₂	50	80,3 ± 9,5	75,2 ± 13,0
	100	83,4 ± 13,5	80,1 ± 5,5
	300	80,4 ± 6,4	78,1 ± 5,1
	1000	77,2 ± 3,4	73,7 ± 3,7
	μ	80,3 ± 8,2	76,8 ± 6,8
PGF _{2α}	50	78,5 ± 2,9	78,1 ± 2,7
	100	86,0 ± 2,7	83,5 ± 4,4
	300	84,3 ± 2,7	80,1 ± 2,5
	1000	80,9 ± 2,3	80,7 ± 2,6
	μ	82,4 ± 2,7	80,6 ± 3,1

Tabelle 3-9: Ergebnisse von relativer und absoluter Wiederfindung für die Extraktion von PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ aus ACSF-Standards. Die Endkonzentration von [²H₄]-PGD₂ betrug in allen Versuchen 4 ng/ml. Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) ± Standardabweichung (SD).

Zur Bestimmung der relativen Wiederfindung wurde die Peakfläche der extrahierten Proben (Ansatz A) mit der Peakfläche der dotierten Doppelblindproben (Ansatz B) verglichen, die nach dem Abdampfen mit Standards im Probensolvens dotiert wurden. Die mittlere relative Wiederfindung war über den untersuchten Konzentrationsbereich konstant und betrug für PGE₂ 82,4 % ± 4,8 %, die von PGD₂ 80,3 % ± 2,6 % und die des internen Standards, [²H₄]-PGD₂, 82,4 % ± 2,4 % (Tabelle 3-9). Dagegen wurde die absolute Wiederfindung durch den Vergleich der Peakflächen der extrahierten Proben (Ansatz A) mit nicht extrahierten und matrixfreien Lösungsmittelstandards (Ansatz C) ermittelt. Die mittlere absolute Wiederfindung war ebenfalls über den untersuchten Konzentrationsbereich konstant und betrug 80,8 % ± 4,8 % für PGE₂, 76,8 % ± 6,9 % für PGD₂ und 80,6 % ± 3,1 % für den internen Standard, [²H₄]-PGD₂ (Tabelle 3-9).

3.3.5 Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte

Um Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte zu bestimmen, wurden 36 Doppelblindproben nach 3.2.5 hergestellt und extrahiert. Nach dem Abdampfen wurden die Doppelblindproben mit je 50 µl Lösungsmittel-Standard in Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen. Der Lösungsmittelstandard entsprach der Stoffmenge eines extrahierten 200 pg/ml Kalibrationsstandards von PGE₂ und PGD₂ und enthielt den internen Standard, [²H₄]-PGD₂, in einer Endkonzentration von 4 ng/ml. Die Peakflächen der 36 dotierten Doppelblindproben wurden mit 36 matrixfreien Lösungsmittel-Standards der gleichen Stoffmenge verglichen. Ein minimaler Signal-abschwächender Effekt konnte für alle drei Prostaglandine festgestellt werden. Für PGE₂ konnte eine Ionensuppression von 7 % ± 5,1 %, für PGD₂ 7,9 % ± 8 % und für den internen Standard, [²H₄]-PGD₂, 6 % ± 5,9 % ermittelt werden (Tabelle 3-10).

Die Peakflächenverhältnisse von PGE₂ bzw. PGD₂ zum internen Standard, [²H₄]-PGD₂, der 36 dotierten Doppelblindproben wurden mit denen der 36 matrixfreien Lösungsmittel-Standards der gleichen Stoffmenge verglichen. Dabei ergaben sich keine Unterschiede und der interne Standard, [²H₄]-PGD₂, kann ohne Schwierigkeiten zur Quantifizierung von PGE₂ und PGD₂ verwendet werden.

Matrixeffekte	
Analyt	$\mu \pm SD$ (%, n = 36)
PGE₂	93,0 ± 5,1
PGD₂	92,1 ± 8,0
[²H₄]-PGD₂	94,0 ± 5,9

Tabelle 3-10: Ergebnisse der Bestimmung von Matrixeffekten für die Extraktion von PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂. Die Konzentration von allen Substanzen entsprach einem extrahierten 200 pg/ml Standard. Die Endkonzentration des internen Standards, [²H₄]-PGD₂, betrug 4 ng/ml. Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) ± Standardabweichung (SD).

3.3.6 Stabilität

3.3.6.1 Stabilität über 1 Woche

Die Stabilität unter den Lagerungsbedingungen von PGE₂ und PGD₂ wurde mit einer niedrigen und einer hohen Konzentration (50 und 1000 pg/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde acht Mal in ACSF angesetzt, extrahiert und trocken unter Stickstoffatmosphäre bei -80°C eingefroren. Nach einer Woche wurden die Proben in 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Die Lagerungsbedingungen von -80°C hatten keinen Einfluss auf die Stabilität von PGE₂ und PGD₂ (Tabelle 3-11).

3.3.6.2 Einfrier-Auftau-Stabilität

Die Einfrier-Auftau-Stabilität von PGE₂ und PGD₂ wurde mit einer niedrigen und einer hohen Konzentration (50 und 1000 pg/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde acht Mal nach 3.2.5 angesetzt, extrahiert und trocken unter Stickstoffatmosphäre bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend wieder bei -80°C eingefroren. Der Zyklus wurde zwei weitere Male wiederholt und die Proben nach dem dritten Auftauen in 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Die drei Einfrier-Auftau-Zyklen hatten keinen Einfluss auf die Stabilität von PGE₂ und PGD₂ (Tabelle 3-11).

3.3.6.3 Kurzzeit-Stabilität

Zur Bestimmung der Kurzzeit-Stabilität von PGE₂ und PGD₂ wurden zwei verschiedene Konzentrationen (50 und 1000 pg/ml) acht Mal in ACSF angesetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Proben nach 3.2.5 extrahiert und in 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Während der Aufarbeitung konnte keine Beeinflussung der Stabilität festgestellt werden (Tabelle 3-11).

3.3.6.4 Proben-Stabilität im Autosampler

Zur Bestimmung der Kurzzeit-Stabilität von PGE₂ und PGD₂ wurden zwei verschiedene Konzentrationen (50 und 1000 pg/ml) je acht Mal nach 3.2.5 angesetzt, extrahiert, und in 50 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und in Glasfläschchen mit 200 µl Mikroinsätzen umgefüllt. Anschließend wurden die Proben 24 h lang im Autosampler bei Raumtemperatur (22 ± 1°C) aufbewahrt und anschließend gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Während der Lagerung unter Messbedingungen konnte keine Beeinflussung der Stabilität festgestellt werden (Tabelle 3-11). Die größere Abweichung bei 50 pg/ml PGD₂ liegt im Rahmen der Messungenauigkeit, da 50 pg/ml dem LLOQ für PGD₂ entspricht.

Analyt	Konzentration (pg/ml)	Stabilität über 1 Woche	Einfrier-Auftau- Stabilität	Kurzzeit- Stabilität	Proben- Stabilität
		$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE₂	50	103,3 ± 4,5	106,9 ± 7,9	99,5 ± 3,2	95,9 ± 3,9
	1000	105,7 ± 2,9	105,8 ± 2,2	98,9 ± 2,8	99,3 ± 3,7
	μ	104,5 ± 3,7	106,4 ± 5,1	99,2 ± 3,0	97,6 ± 3,8
PGD₂	50	104,5 ± 4,8	101,9 ± 6,3	98,4 ± 3,9	90,6 ± 7,8
	1000	104,4 ± 1,9	104,1 ± 3,6	100,3 ± 3,5	103,5 ± 3,5
	μ	104,5 ± 3,4	103,0 ± 5,0	99,4 ± 3,7	97,1 ± 5,7

Tabelle 3-11: Zusammenfassung der Stabilitäten von ACSF-Kalibrationsstandards.

3.3.6.5 Stabilität der Stammlösungen

Zur Ermittlung der Stabilität der Stammlösung I (je 10.000 ng/ml PGE₂ und PGD₂ in Methanol) und Stammlösung II (1000 ng/ml [²H₄]-PGD₂ in Methanol) unter Raumtemperatur wurde jede Stammlösung je 6 Mal in 1,8 ml Glasfläschchen angesetzt und bei Raumtemperatur und normalem Tageslicht gelagert. Nach sechs Stunden wurde jede Stammlösung auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit Methanol/Ameisensäure (100:0,4, v/v) verdünnt und gegen eine frisch hergestellte methanolische Standardreihe von PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ (1 bis 200 ng/ml) gemessen. Aufgrund der hohen Konzentration wurden nur 10 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Bedingungen hatten keinen Einfluss auf die Konzentration der gemessenen Stammlösungen (Tabelle 3-12).

Stabilität der Stammlösungen	
Analyt	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE₂	101,3 ± 2,0
PGD₂	103,2 ± 4,3
[²H₄]-PGD₂	104,7 ± 4,1

Tabelle 3-12: Stabilität der Stammlösung I (10.000 ng/ml PGE₂ und 10.000 ng/ml PGD₂) und Stammlösung II (1.000 ng/ml [²H₄]-PGD₂). Beide Stammlösungen wurden für die Stabilitätsbestimmung auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit Methanol/Ameisensäure (100:0,4, v/v) verdünnt.

3.3.7 Ergebnisse der Methodvalidierung

Sämtliche Validierungsparameter sollten mit einer biologischen Leermatrix bestimmt werden, die die zu quantifizierenden Analyten nicht enthält. Dies ist bei der Bestimmung von Arzneistoffen, z.B. im Humanplasma, möglich, aber nicht bei der Quantifizierung von physiologisch vorkommenden Substanzen, wie z.B. Prostaglandinen. Deswegen wurde ACSF als Leermatrix für die Methodvalidierung ausgewählt, da sie zur Gewinnung der Mikrodialysate verwendet wird.

Die Selektivität der Methode wurde während der Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision mit Blind- und Doppelblindproben bestimmt, in denen keine Interferenzen zur Retentionszeit von PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ auftraten.

Die Spezifität der Methode wurde mit verschiedenen Prostaglandinen während der Methodenentwicklung untersucht. PGH₂, Δ^{12} -PGD₂ und Δ^{12} -PGE₂ kommen als mögliche Interferenzen mit der validierten LC-MS/MS-Methode in Frage, aber es ist unwahrscheinlich, dass diese 3 Prostaglandine die Bestimmung von Mikrodialysaten stören (siehe unter 3.2.2).

Die zukünftigen Richtlinien der FDA fordern, dass die Richtigkeit eines einzigen Kalibrationsstandards maximal 15 % vom richtigen Wert (*SD* 85 % bis 115 %) und mit einer maximalen Standardabweichung (*SD*) von ± 15 % abweichen dürfen. Dies wird von der validierten Methode für PGE₂ von 25 bis 1000 pg/ml und für PGD₂ von 50 pg/ml bis 1000 pg/ml für PGD₂ erfüllt. Die gemittelte Richtigkeit in diesen Konzentrationsbereichen beträgt 99,9 % \pm 6,1 % für PGE₂ und 100,0 % \pm 5,6 % für PGD₂. Aufgrund der Auswertung ergibt sich eine Quantifizierungsgrenze von 25 pg/ml für PGE₂ mit einer Richtigkeit von 100,2 % \pm 4,3 % und 50 pg/ml für PGD₂ mit einer Richtigkeit von 99,1 % \pm 6,1 %.

Als Kriterium für die Präzision der Methode, legt die FDA fest, dass die relative Standardabweichung (*RSD*) bei wiederholten Bestimmungen von Kalibrationsstandards ≤ 15 % (*RSD* 85 % bis 115 %) beträgt. Dies gilt sowohl für die Bestimmung der Intraday- als auch der Interday-Präzision. Sämtliche Kriterien wurden von der entwickelten Methode im Konzentrationsbereich von 25 pg/ml bis 1000 pg/ml für PGE₂ und von 50 pg/ml bis 1000 pg/ml für PGD₂ erfüllt.

Aus den Ergebnissen der Richtigkeit und Präzision ergibt sich als endgültige Quantifizierungsgrenze der Methode 25 pg/ml für PGE₂ und 50 pg/ml PGD₂ in ACSF-Kalibrationsstandards.

Für die Bestimmung der absoluten und relativen Wiederfindung gibt die FDA zwar keine Minimalwerte an, die Wiederfindung von internem Standard und Analyt sollte sich aber nur um maximal 15 % unterscheiden und über den Konzentrationsbereich konstant sein. Dies wird von der entwickelten Methode erfüllt. Die mittlere relative Wiederfindung von PGE₂ beträgt 82,4 % \pm 4,8 %, die von PGD₂ 80,3 % \pm 2,6 % und die des internen Standards, [²H₄]-PGD₂, 82,4 % \pm 2,4 %. Die mittlere absolute Wiederfindung beträgt 80,8 % \pm 4,8 % für PGE₂, 76,8 % \pm 6,9 % für PGD₂ und 80,6 % \pm 3,1 % für den internen Standard, [²H₄]-PGD₂. Zwar konnte für PGE₂, PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ eine leichte Ionensuppression von 7 % \pm 5,1 %, 7,9 % \pm 8 % bzw. 6 % \pm 5,9 % ermittelt werden, da diese aber vom internen Standard kompensiert wird, gibt es keine Schwierigkeiten bei der Auswertung der Daten.

Während der Bestimmung der Stabilität von PGE₂ und PGD₂ unter verschiedenen Bedingungen konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

Die Methode zur Bestimmung von PGE₂ und PGD₂ in Mikrodialysaten von Ratten entspricht aufgrund aller Validierungsparameter den Richtlinien der FDA.

3.4 Mikrodialysestudie

3.4.1 Durchführung

Um die Konzentration von PGE₂ und PGD₂ im Lumbalmark zu bestimmen, wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur $24 \pm 0,5$ °C; Hell-Dunkel-Zyklus 12/12 h), konnten sich innerhalb ihres Plexiglas Käfigs frei bewegen und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Die Tierethikkommission des Regierungspräsidiums Darmstadt genehmigte die Versuche.

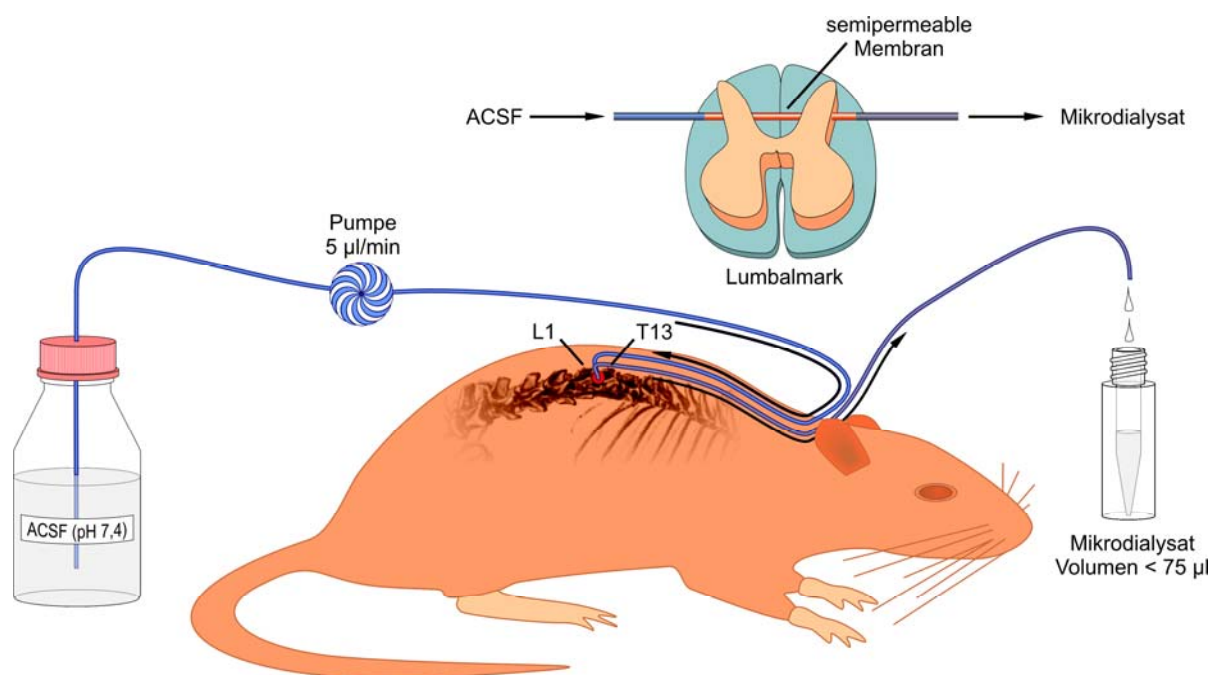


Abbildung 3-10: Prinzip der Mikrodialyse. ACSF wird mit einer Geschwindigkeit von 5 µl/min durch eine semipermeable Membran (rot) gepumpt, die auf Höhe des Hinterhorns zwischen L1 und T13 implantiert wurde. Prostaglandine des Lumbalmarks diffundieren durch die semipermeable Membran in die ACSF-Lösung und werden als Mikrodialysat in einem Glasfläschchen aufgefangen.

Zur Gewinnung der Mikrodialysate musste ein Katheter durch das Lumbalmark implantiert werden (Prinzip in Abbildung 3-10). Dazu wurden die Tiere mit 100 mg/kg Ketamin i.p. (Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen) und 5 mg/kg Xylazin i.p. (Rompun®, Bayer, Leverkusen) narkotisiert und anästhesiert. Während der Operation wurde die Narkose durch Inhalation von 1-1,5 vol.% Isofluran (Abbott, Wiesbaden) aufrechterhalten und ein Absinken der Körpertemperatur unter 37°C mit Hilfe eines Heizpads (CMA, Stockholm, Schweden) verhindert. Anschließend wurde die Haut über der Wirbelsäule eingeschnitten und das Muskelgewebe des Wirbels T13 und L1 entfernt. Mit einem Diamantbohrer wurde ein Loch transversal durch das Hinterhorn des Wirbels T13 gebohrt und durch dieses ein Schlauch aus einer semipermeablen Membran (AN69, 0,2 mm I.D., Massen cut-off ~40 kDa,

Hospital, Nürnberg) geschoben. Dessen Enden wurden mit zwei Polyethylenkathetern verbunden, die subkutan vom Genick bis zum Lumbalmark implantiert wurden. Die beiden anderen Enden der Polyethylenkatheter wurden am Genick herausgeführt. Am Ende der Operation erhielten die Tiere zur postoperativen Analgesie noch einmal 50 mg/kg Ketamin i.p.

Für die Mikrodialysestudie wurden nur Tiere verwendet, die nach einer Erholungsphase von 24 Stunden nach der Operation keine neurologischen Auffälligkeiten zeigten. Die beiden Polyethylenkatheter wurden anschließend mit einer Mikrodialysepumpe verbunden (CMA100, CMA, Stockholm, Schweden) und mit ACSF perfundiert (5 µl/min). In die Hinterpfote der Ratten wurden entweder 15 µl Formalin (5 vol. % in 0,9 % NaCl) oder 15 µl 0,9 % NaCl als Kontrolle injiziert. Insgesamt wurden drei Tiere mit Formalin und drei Tiere mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelt. Das Mikrodialysat wurde für jeweils 15 Minuten in Glasfläschchen aufgefangen (Probenvolumen max. 75 µl) und anschließend bei -20°C eingefroren. Die Probennahme begann 2 Stunden vor der Formalin- bzw. Salzinjektion, um die Prostaglandin-Basiskonzentrationen zu bestimmen, und endete nach insgesamt 5 Stunden. Sämtliche Mikrodialysate wurden noch am gleichen Tag nach 3.2.5 extrahiert und innerhalb von 3 Tagen mit dem LC-MS/MS-System analysiert.

3.4.2 Ergebnisse

Etwa 15 Minuten nach der Injektion von Formalin stieg die PGE₂-Konzentration im Lumbalmark auf 380 pg/ml an und erreichte nach einer Stunde wieder Basalwerte. Die drei Tiere der Kontrollgruppe zeigten dagegen keinen Anstieg der PGE₂-Konzentration (Abbildung 3-11). Die Konzentrationen von PGD₂ lagen leicht unterhalb der Quantifizierungsgrenze (50 pg/ml) der validierten LC-MS/MS-Methode, so dass eine Aussage bezüglich PGD₂ nicht eindeutig getroffen werden kann. Es scheint aber, dass PGD₂ bei der Nozizeption nicht beteiligt ist.

Dass in der Studie Δ¹²-PGD₂ anstatt PGD₂ quantifiziert wurde, konnte aufgrund der Verwendung von [²H₄]-PGD₂ als interner Standard ausgeschlossen werden, da die Differenz der Retentionszeiten von [²H₄]-PGD₂ und dem beobachteten Peak dem der Kalibrationsstandards in ACSF entsprach.

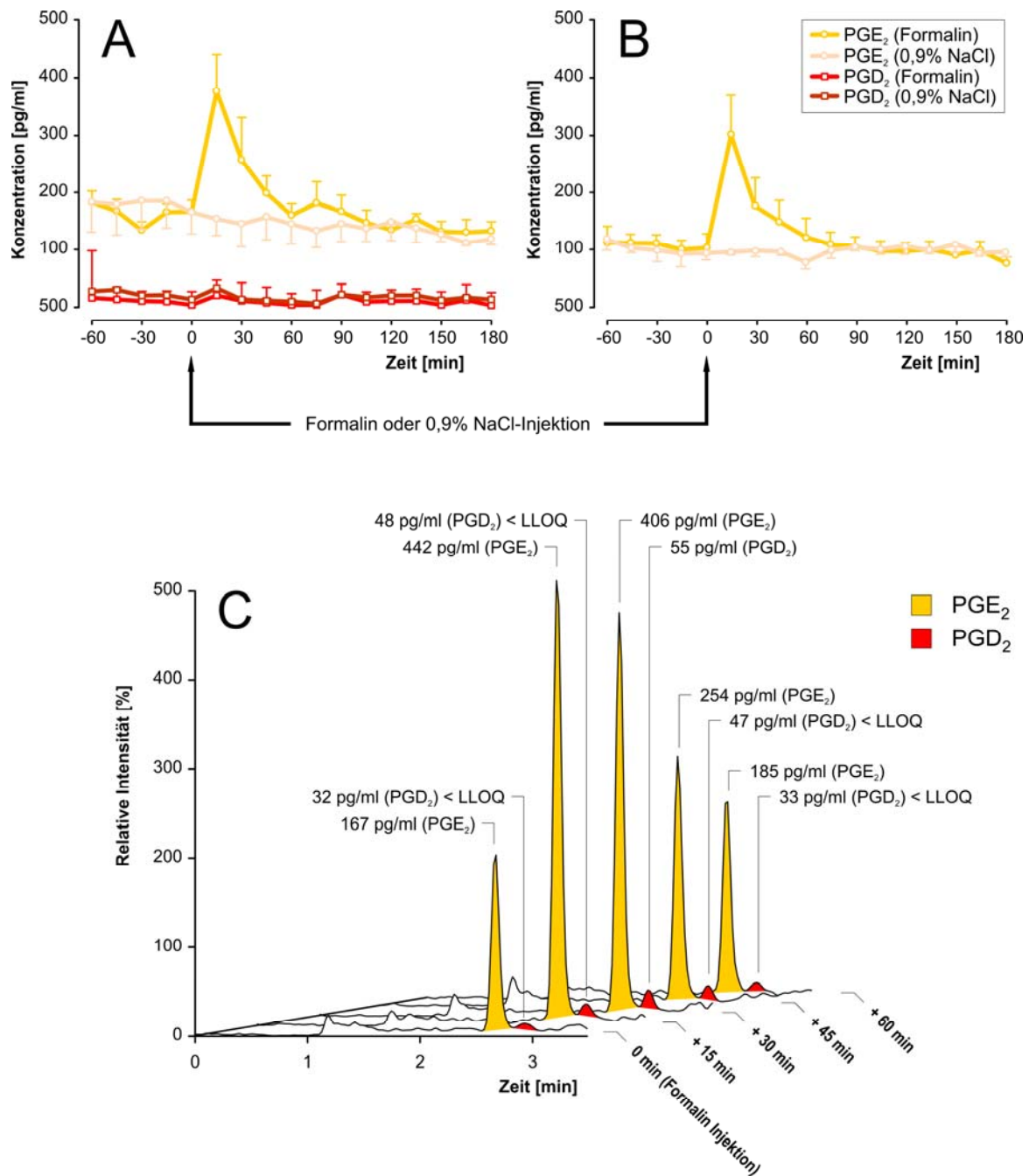


Abbildung 3-11: Vergleich von LC-MS/MS und Immunoassay von Mikrodialysaten. **A** Das Diagramm stellt die Ergebnisse der LC-MS/MS-Methode für PGE₂ und PGD₂ (n = 3) dar. **B** Das Diagramm zeigt die Ergebnisse eines PGE₂-Immunoassays [1] (n = 8). In beiden Diagrammen sind die Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. **C** zeigt die Chromatogramme und zugehörigen PGE₂- und PGD₂-Konzentrationen einer mit Formalin behandelten Ratte.

3.5 Diskussion und Zusammenfassung

Obwohl LC-MS/MS-basierte Systeme im Vergleich zu herkömmlichen HPLC-Anlagen extrem teuer sind (mehrere hunderttausend Euro), werden sie in den letzten Jahren aufgrund ihrer hohen Sensitivität, Selektivität, schnellen Analysenzeiten und einfacheren Probenaufarbeitung immer häufiger in analytischen Laboratorien vor allem für pharmakokinetische Studien von Arzneistoffen verwendet. Die Funktionsweise eines LC-MS/MS-Systems ermöglicht im Gegensatz zu Immunoassays die gleichzeitige Bestimmung mehrerer Substanzen in einer einzigen Probe. Aufgrund dieser Vorteile sollte eine Methode entwickelt werden, mit der PGE₂ neben PGD₂ und anderen Prostaglandinen in Mikrodialysaten von Ratten bestimmt werden kann. Die niedrigsten Konzentrationen von PGE₂, die bisher mit Immunoassays in Mikrodialysaten bestimmt worden sind, betragen etwa 40 pg/ml [86]. Somit musste eine Quantifizierungsgrenze der LC-MS/MS-Methode für PGE₂ erreicht werden, die unterhalb dieser Konzentration liegt.

Die Entwicklung einer LC-MS/MS-Methode für PGE₂ und andere Prostaglandine gestaltete sich aus verschiedenen Gründen als sehr schwierig. Zum einen sind die Massenspektren von PGE₂ und PGD₂ nahezu identisch und zur Erreichung der nötigen Sensitivität musste sowohl für die Bestimmung von PGE₂ als auch für PGD₂ der gleiche Massenübergang m/z 351 \rightarrow m/z 271 verwendet werden. Um eine Kreuzreaktivität von PGE₂ und PGD₂ durch die Verwendung des gleichen Massenübergangs zu verhindern, war es notwendig, eine Chromatographie zu entwickeln, die PGE₂ und PGD₂ voneinander trennen kann. Dies ist zwar mit der Verwendung von Acetonitril-Wasser-Ameisensäure-Mischungen möglich, doch führt die Zugabe von Ameisensäure zu einer rapiden Verschlechterung der Sensitivität der Prostaglandine (Faktor > 7-8).

Einen extrem großen Einfluss auf die Sensitivität von PGE₂ hat auch die verwendete chromatographische Säule. Obwohl eine Trennung von PGE₂ und PGD₂ auf fast allen modifizierten und nicht-modifizierten Phenyl-, Phenyl-Hexyl-, C₈-, C₁₈-, Polymer- und reinen Kohlenstoffphasen mit Acetonitril-Wasser-Ameisensäure-Mischungen möglich ist, war die beste Empfindlichkeit nur auf neueren Materialien der Firma Phenomenex (Synergi Hydro-RP und Synergi MAX-RP) mit einem Gradientensystem zu erreichen. Als optimal erwies sich eine Synergi Hydro-RP in einer Dimension von 150 x 2,0 mm (4 µm Partikelgröße). Doch erst durch die Verwendung von Ameisensäure-freien mobilen Phasen, einem optimierten Probensolvens, das 0,1 % Ameisensäure enthielt, und einem Injektionsvolumen von 35 µl konnte mit der Synergi Hydro-RP die geforderte Quantifizierungsgrenze von < 40 pg/ml PGE₂ erreicht werden.

Aufgrund der einfachen Zusammensetzung der Mikrodialysate gestaltete sich die Optimierung der Extraktionsmethode als relativ einfach. Einmaliges Ausschütteln mit 1200 µl Ethylacetat war ausreichend, um PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂ in guter Ausbeute aus den Mikrodialysaten zu extrahieren. Nach der Extraktion wurden die Proben in 50 µl Probensolvens aufgenommen und davon

35 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Injektion der gesamten Probe war für das Erreichen der Quantifizierungsgrenze von 25 pg/ml für PGE₂ notwendig.

Während der Vortests mit einer Formalin behandelten Ratte zeigte sich jedoch, dass nur PGE₂ und PGD₂ in Mikrodialysaten detektierbar waren und die Methode wurde deshalb nur für PGE₂ und PGD₂ validiert. Während der Methodenvalidierung gab es außer Verunreinigungen in Eppendorf Reaktionsgefäßen keine Auffälligkeiten. Die Störpeaks traten nach Waschen der Reaktionsgefäße mit Methanol und Ultraschallbehandlung nicht mehr auf.

Um die Eignung der entwickelten Methode zu testen, wurde eine Mikrodialysestudie mit drei Formalin behandelten Ratten und drei Kontrollratten durchgeführt. Für PGE₂ ergaben sich bereits 15 Minuten nach der Injektion von Formalin ein maximaler PGE₂-Spiegel von 380 pg/ml, der innerhalb einer Stunde wieder auf Basalwerte absank. Obwohl die Konzentrationen von PGD₂ leicht unterhalb der Quantifizierungsgrenze (50 pg/ml) lagen, scheint PGD₂ nicht an der Nozizeption beteiligt zu sein.

Die bisherigen Ergebnisse von PGE₂-Immunoassays konnten mit der LC-MS/MS-Methode bestätigt werden.

4. mPGES-1-Aktivitäts-Assay

4.1 Zielsetzung

Nachdem 1999 die mPGES-1 entdeckt und eine funktionelle Kopplung mit COX-II festgestellt wurde [38], entstand sehr schnell die Idee, mPGES-1 als neue Zielstruktur für die Entwicklung von schmerzhemmenden Arzneimitteln zu verwenden. Durch den späteren und selektiveren Angriff im Arachidonsäurestoffwechsel könnten so Nebenwirkungen im Vergleich zu COX-I/II-Inhibitoren vermieden werden.

Um das Potential verschiedener Substanzen, die mPGES-1 zu hemmen, bestimmen zu können, entwickelten Jakobsson und Thoren einen Assay zur Bestimmung der mPGES-1-Aktivität in A549-Zellen (humane Lungen-Karzinom-Zelllinie) und HeLa-Zellen (humane Zervix-Karzinom-Zelllinie), der auf herkömmlicher UV-HPLC (195 nm) basiert [38,42]. Die gesamte Laufzeit beträgt 40 min und die Retentionszeiten von PGF_{2α}, PGE₂ und PGD₂ 19,0; 23,8 und 28,6 min. Mit diesem Assay (96er Mikrotiterplatte) ergibt sich inklusive Qualitätskontrollen eine Gesamtanalysenzeit von ca. 80-90 Stunden.

Das Grundprinzip des Assays basiert auf der katalytischen Umsetzung von PGH₂ zu PGE₂ durch mPGES-1. Dazu wird eine mikrosomale Fraktion aus inkubierten Zellen gewonnen und mit PGH₂ bei pH 7,4 eine Minute lang auf Eis inkubiert, da die Reaktion bei physiologischen 37°C zu schnell ablaufen würde. Um die Reaktion zu stoppen, wird eine Lösung mit FeCl₂ und Zitronensäure zugegeben, welche nicht umgesetztes überschüssiges PGH₂ in 12-HHT umsetzt [66]. Das entstehende PGE₂ wird anschließend mittels Festphasenextraktion (C₁₈-Material) extrahiert, in das HPLC-System injiziert und die Konzentration von PGE₂ bestimmt, das proportional zur Aktivität der mPGES-1 gebildet wird. Für verschiedene Substanzen kann so der IC₅₀ für eine Hemmung der mPGES-1 ermittelt werden.

Jakobssons HPLC-Methode sollte auf ein LC-MS/MS-System übertragen werden, so dass PGE₂ spezifischer und in wesentlich kürzerer Messzeit bestimmt werden kann. Um flexibel die vorhandenen Massenspektrometer auszunutzen, wurde die Methode sowohl auf Anlage I als auch auf Anlage II validiert.

4.2 Methodenentwicklung

4.2.1 Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen

Da die Proben des mPGES-1-Aktivitäts-Assays auch auf Anlage II bestimmt werden sollten und es sich bei dieser um ein anderes Tandem-Massenspektrometer handelte, mussten sämtliche Prostaglandine erneut für das Massenspektrometer optimiert werden. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit des API 4000 (Anlage II) gegenüber dem API 3000 (Anlage I) wurden die Prostaglandine mit einer Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min und in einer Konzentration von 200-1000 ng/ml in Methanol infun-

diert, so dass sich im negativen Ionenmodus und einem Q1-Scan eine Ionenintensität von ca. $1\text{-}2\cdot 10^6$ cps des zu erwartenden Molekülpeaks ergab (Details unter Anhang II).

Sämtliche Massenspektren, zugehörige Massenübergänge und Spannungsparameter aller verwendeten Prostaglandine finden sich in Anhang II. Die Fragmentspektren des API 3000 (Anhang I) waren mit denen des API 4000 vergleichbar (Anhang II). Die zwei empfindlichsten Massenübergänge für die Analyten 6-keto-PGF_{1 α} , TXB₂, PGF_{2 α} , PGE₂, PGD₂ und 12-HHT und die internen Standards [²H₄]-PGE₂ und [²H₄]-PGD₂ wurden anschließend in einer einzigen MRM-Methode vereinigt.

4.2.2 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Eine Übertragung der sensitiven LC-MS/MS-Methode aus Abschnitt 3 auf die neue Anlage II war aus verschiedenen Gründen nicht möglich. Zum einen handelt es sich bei Anlage II um ein binäres Pumpensystem und die Verwendung von Lösungsmittelgemischen wird vom Hersteller des Tandem-Massenspektrometers (Applied Biosystems) nicht empfohlen. Der Grund für diese Empfehlung ist die Verwendung von Standzylindern, mit denen ein Lösungsmittelgemisch hergestellt werden muss und welche nicht völlig frei von Spülmittelresten sind. Der permanente Fluss von diesen Kontaminationen kann zu Signalsuppressionen aber auch zur Verunreinigung des Massenspektrometers führen. Da PGE₂ und PGD₂ mit sauren Acetonitril/Wasser-Mischungen getrennt werden müssen, konnte im Gegensatz zu Kapitel 3 kein Methanol mehr als mobile Phase B eingesetzt werden, da nur 2 Kanäle (A: Wasser, B: Acetonitril) gleichzeitig verwendet werden können. Aus diesem Grund musste der Gradient aus Abschnitt 3 abgeändert werden. Als mobile Phase A wurde Acetonitril/Wasser (40:60) und als mobile Phase B Acetonitril anstatt Methanol verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 500 $\mu\text{l/min}$. Die Proben wurden zunächst in 50 μl Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) aufgenommen und 35 μl injiziert.

Anlage I (API 3000)			Anlage II (API 4000)		
Zeitpunkt	Mobile Phase A	Mobile Phase B	Zeitpunkt	Mobile Phase A	Mobile Phase B
0 min	100 %	0 %	0 min	60 %	40 %
0,8 min	100 %	0 %	0,3 min	60 %	40 %
4,0 min	0 %	100 %	3,5 min	0 %	100 %
5,0 min	0 %	100 %	4,5 min	0 %	100 %
5,3 min	100 %	0 %	4,8 min	60 %	40 %
9,5 min	100 %	0 %	8,5 min	60 %	40 %

Tabelle 4-1: Gradientenzusammensetzung. Auf Anlage I wurde als mobile Phase A Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (40:60:0,1, v/v, pH 2,8) und als mobile Phase B Acetonitril/Ameisensäure (100:0,1, v/v) verwendet. Auf Anlage II wurde dagegen als mobile Phase A Wasser/Ameisensäure (100:0,1, v/v, pH 2,8) und als mobile Phase B Acetonitril/Ameisensäure (100:0,1, v/v) eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit auf beiden Anlagen betrug 500 $\mu\text{l/min}$ und das Injektionsvolumen 20 μl . Als Probensolvens wurde Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) verwendet.

In Vorversuchen zeigte sich allerdings, dass zwischen PGE_2 und PGD_2 ein hoher Störpeak (Abbildung 4-2 B) auftritt, der die Quantifizierung von PGE_2 und PGD_2 erheblich erschwerte. Um eine bessere Trennung zwischen PGE_2 , PGD_2 und dem Störpeak zu erreichen, wurde dem Fließmittel Ameisensäure in einer Konzentration von 0,1 % (v/v) zugesetzt und der Gradient so verändert, dass PGE_2 und PGD_2 noch unter isokratischen Bedingungen getrennt und vom Gradienten nicht erfasst werden (Tabelle 4-1). Zwar wurde in Kapitel 3 ein erheblicher Empfindlichkeitsverlust durch einen 0,1 %igen Ameisensäurezusatz auf Anlage I im Fließmittel festgestellt, allerdings stellt dies bei der zu entwickelnden Methode kein Problem dar, da die niedrigsten PGE_2 -Konzentrationen in den Vorversuchen bei 66 ng/ml lagen (siehe 4.2.4). Aufgrund der hohen Prostaglandin-Konzentrationen wurde das Injektionsvolumen von 35 auf 20 μl herabgesetzt.

Als mögliche Interferenzen kommen die gleichen Substanzen wie in Kapitel 3 in Frage: PGH_2 , $\Delta^{12}\text{-PGE}_2$ und $\Delta^{12}\text{-PGD}_2$. Bei der Untersuchung des PGH_2 (Larodan) auf Sauberkeit stellte sich heraus, dass dieses einen zusätzlichen Peak bei einer Retentionszeit von 3,9 min aufweist, der bei der PGH_2 -Standardsubstanz von Cayman Chemicals während der Bestimmung möglicher Interferenzen in Kapitel 3.2.2 nicht beobachtet wurde. Zuerst wurde davon ausgegangen, dass das PGH_2 von Larodan nicht ganz sauber sei, weshalb 10 μl PGH_2 (100.000 ng/ml in Aceton) in 990 μl PBS gelöst und auf 40°C erhitzt wurden. Die Lösung wurde in Abständen von 20 Minuten in Anlage II injiziert. Innerhalb von 3 Injektionen nahm der Peak bei 4 min im gleichen Verhältnis ab, wie PGE_2 und PGD_2 entstanden (Abbildung 4-1), weshalb davon ausgegangen werden muss, dass das PGH_2 von Cayman nicht in Ordnung war.

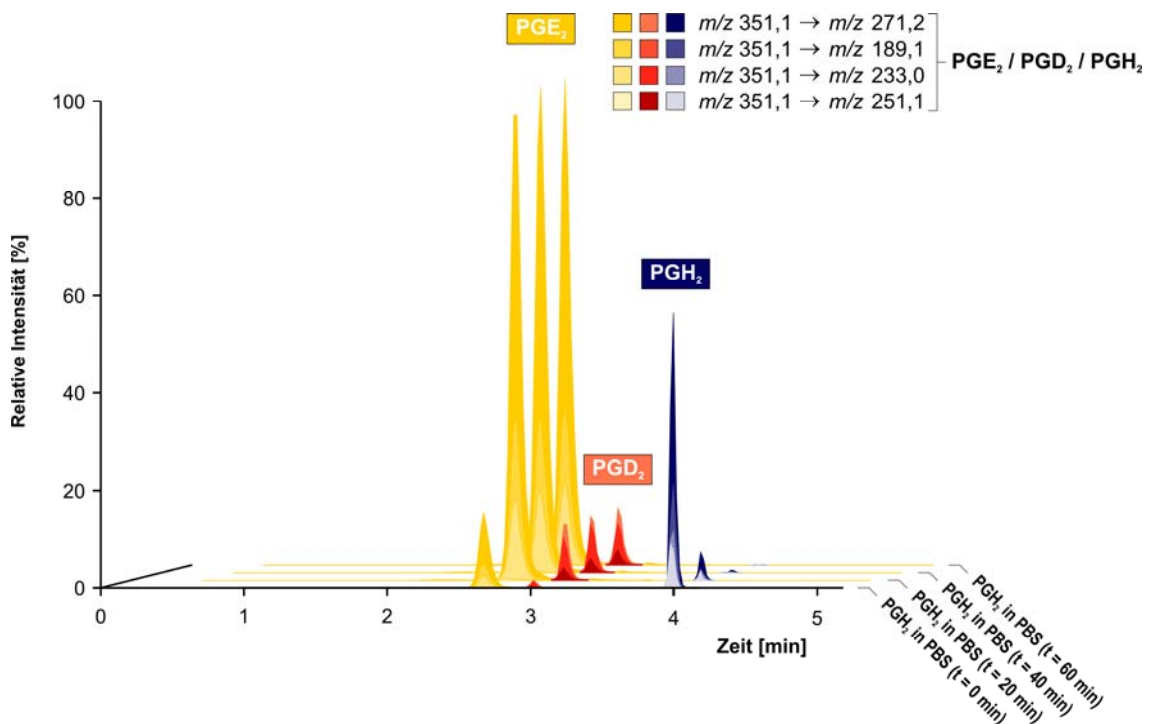


Abbildung 4-1: Umwandlung von 1000 ng/ml PGH_2 zu PGE_2 und PGD_2 in PBS bei 40°C.

Prof. Dr. Per-Johan Jakobsson konnte diese Vermutung bestätigen, in dessen Labor der mPGES-1-Assay mit mehreren Chargen PGH₂ von Cayman nie funktioniert hatte. Leider stand das verwendete PGH₂ von Cayman für einen Vergleich mit PGH₂ von Larodan unter gleichen Bedingungen nicht mehr zur Verfügung. Eine zweite Charge von Larodan zeigte jedoch das gleiche Verhalten wie die erste Charge von Larodan und der Peak bei 4 min müsste dementsprechend PGH₂ sein und interferiert somit weder mit PGE₂ noch mit PGD₂.

4.2.3 Optimierung der Aufarbeitung

Aufgrund der relativ unkomplizierten Probenmatrix wurde zunächst eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat getestet. Dazu wurden 100 µl Probensolvens, 20 µl Standard in Methanol/Wasser (1:1, v/v) und 20 µl interne Standard-Lösung (500 ng/ml PGE₂ und 250 ng/ml PGD₂ in Methanol/Wasser (1:1, v/v)) drei Mal mit je 400 µl Ethylacetat ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde anschließend bei 45°C und einem leichten Stickstoffstrom abgedampft und der Rückstand in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen. 20 µl wurden auf Anlage I injiziert. Bei der Extraktion von 6 Standardreihen von 1 bis 1000 ng/ml war die Genauigkeit allerdings mangelhaft, weshalb auf Festphasenextraktion gewechselt wurde.

Für die Festphasenextraktion wurden Oasis-HLB-SPE-Kartuschen (1 ml) ausgewählt, welche bei der Extraktion durch unterschiedliche Personen erfahrungsgemäß wenige Probleme bereiten. Diese Kartuschen dürfen im Gegensatz zu gewöhnlichen C₁₈-Standardmaterialien trocken laufen, ohne die Wiederfindung zu beeinträchtigen. Für die Festphasenextraktion wurden 100 µl Probenmaterial mit 20 µl Standard in Methanol/Wasser (1:1, v/v), 20 µl interner Standard-Lösung (500 ng/ml PGE₂ und 250 ng/ml PGD₂ in Methanol/Wasser (1:1, v/v)) und 800 µl Wasser versetzt. Die Kartuschen wurden mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert. Anschließend wurden 940 µl Probe aufgegeben und mit 1 ml Methanol/Wasser (30:70, v/v) gewaschen und für 5 Minuten unter vollem Vakuum getrocknet. Die Prostaglandine wurden anschließend mit Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (35:60:5, v/v) eluiert, unter Stickstoff bei 45 Grad abgedampft, in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen und auf Anlage I injiziert. Die relative Wiederfindung für PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} betrug > 90 %, die von 6-keto-PGF_{1α} 75 % und die von TXB₂ 55 %. Die Extraktion von 3 Standardreihen von 1 bis 1000 ng/ml zeigte für alle fünf Analyten eine gute Richtigkeit von < 5 %.

4.2.4 Vorversuche

Für die Vorversuche wurden isolierte Fraktionen von HeLa-Zellen verwendet und mit MK-886 und Celecoxib inkubiert. 100 µl der jeweiligen Proben wurden mit der Festphasenextraktion aus 4.2.3 extrahiert und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe auf Anlage II gemessen. Die niedrigsten Konzentrationen in den Assays betrugen 66 ng/ml für PGE₂, 33,1 ng/ml für PGD₂, 34 ng/ml für PGF_{2α} und 0,19 ng/ml für TXB₂. 6-keto-PGF_{1α} konnte in den Inkubaten nicht detektiert werden. Die Quantifizie-

rungsgrenze betrug für jedes Prostaglandin ca. 1 ng/ml. 12-HHT wurde ebenfalls in den Proben detektiert, allerdings diente es nur als Kontrolle für die Umsetzung von PGH_2 und wurde für die Methodenvalidierung nicht näher betrachtet.

Aufgrund der schlechten isotopischen Reinheit von $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGF}_{2\alpha}$ (99,1167 %) wurde $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGE}_2$ als interner Standard für $\text{PGF}_{2\alpha}$ verwendet. Dies sollte bei der Methodenvalidierung zu keinen Schwierigkeiten führen, da die relative und absolute Wiederfindung von PGE_2 und von $\text{PGF}_{2\alpha}$ über 90 % beträgt.

Da die Konzentration an TXB_2 in den Vorversuchen unterhalb der Quantifizierungsgrenze lag und 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ nicht detektiert werden konnte, wurde die Methode nur für PGE_2 , PGD_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ validiert.

4.2.4.1 Optimierung der Massenübergänge von PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGE}_2$ und $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$

Für die Auswahl der geeigneten Massenübergänge wurde auf das bereits vorhandene Wissen aus Kapitel 3 zurückgegriffen und für die Bestimmung von PGE_2 das sensitivste Fragment m/z 271 ausgewählt. Bei Verwendung des Massenübergangs m/z 351 \rightarrow m/z 271 trat allerdings ein großer Störpeak (Abbildung 4-2) zwischen PGE_2 und PGD_2 auf, der die Quantifizierung von PGD_2 stört. Um die gesamte Laufzeit nicht unnötig zu verlängern und Sensitivität einzubüßen, wenn der Störpeak chromatographisch von PGE_2 und PGD_2 abgetrennt wird, wurde für die Quantifizierung von PGD_2 der selektive, aber nicht sehr empfindliche Massenübergang m/z 351 \rightarrow m/z 251 verwendet. Bei Verwendung des Massenübergangs m/z 351 \rightarrow m/z 251 trat der Störpeak nicht mehr auf, allerdings reduzierte sich die Empfindlichkeit für PGD_2 auf ca. 20%. Für die Bestimmung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurde der sensitive Übergang m/z 353 \rightarrow m/z 309 verwendet, für $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGE}_2$ m/z 355 \rightarrow m/z 275 und für $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$ m/z 355 \rightarrow m/z 237.

4.2.4.2 Stabilität

Thoren gibt für die Stabilität von PGE_2 bei einer Lagerungstemperatur von -20°C 2 Wochen an. Dies konnte nicht bestätigt werden, denn während der Bestimmung der Kurzzeit-, Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität über 2 Wochen wurden starke Verluste von 20 bis 40 % an PGE_2 und PGD_2 in Thorens mPGES-1-Assay-Lösung beobachtet. $\text{PGF}_{2\alpha}$ war dagegen stabil. Die Ermittlung der Einfrier-Auftau- und Langzeitstabilität wurde zunächst bei einer Lagerungstemperatur von -40°C durchgeführt. Um die Stabilität von PGE_2 und PGD_2 in der mPGES1-Assay-Lösung zu erhöhen, wurden nach Beendigung des mPGES-1-Aktivitäts-Assays je 100 μl der Proben in 1,5 ml Reaktionsgefäße umpipettiert und mit 100 μl 0,15 M EDTA-Lösung versetzt. Da aus Zeit- und Stabilitätsgründen die Proben nicht direkt nach der Durchführung eines mPGES-1-Aktivitäts-Assays extrahiert werden können, wurden die Proben sofort bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die zu bestimmenden Proben in gefrorenem Zustand mit 20 μl internem Standard, 20 μl Methanol/Wasser (50:50, v/v) und 800 μl

Wasser versetzt und sofort mit Oasis-HLB-Kartuschen extrahiert. Die Stabilität der Proben konnte durch den Zusatz von 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung erheblich gesteigert werden.

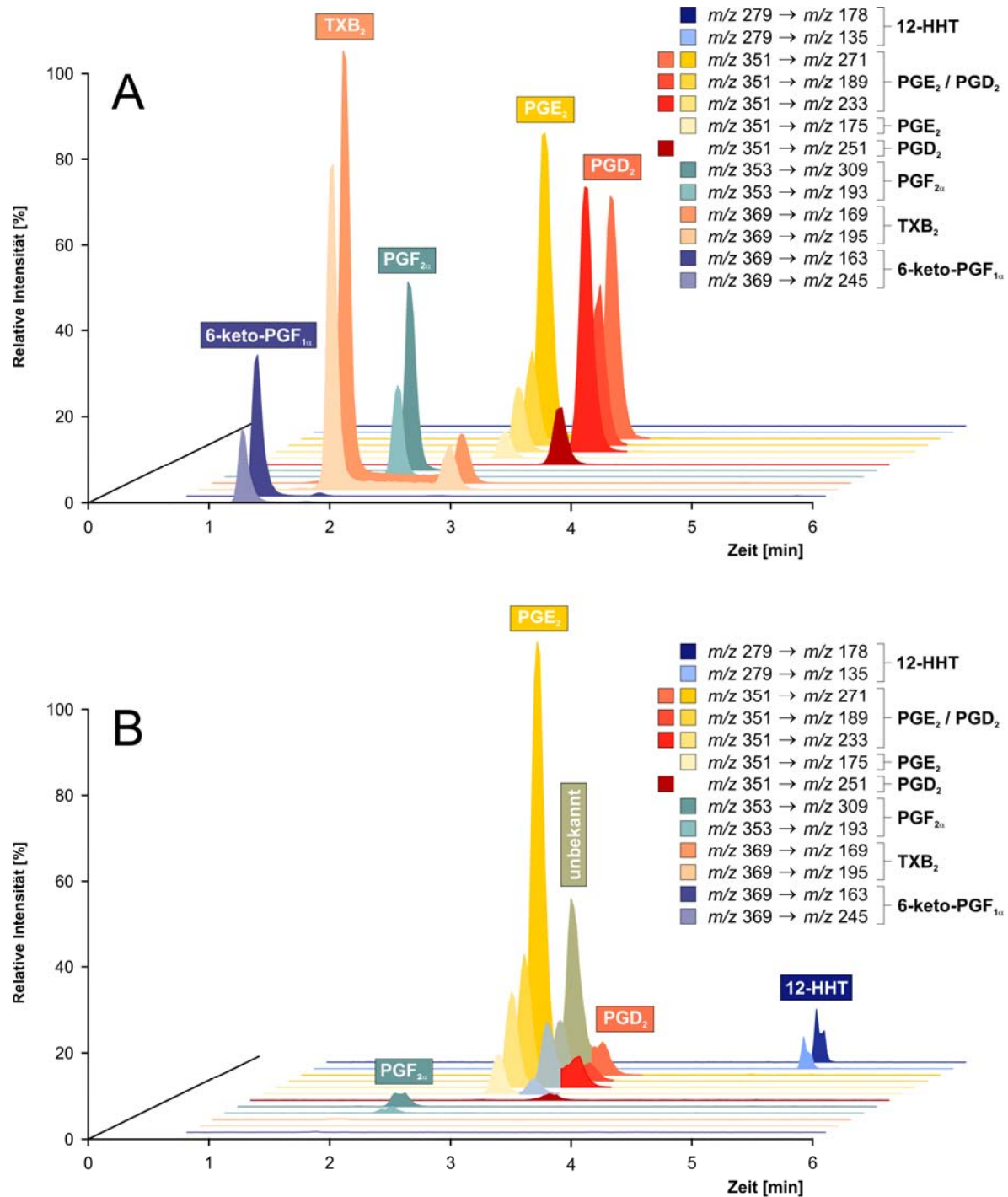


Abbildung 4-2 A. Chromatogramm eines extrahierten 100 ng/ml Standards auf Anlage II. Die Retentionszeiten von 6-keto-PGF_{1α}, TXB₂, PGF_{2α}, PGE₂ und PGD₂, betragen 1,3 min, 1,8 min, 2,2 min, 2,7 min und 3,3 min. **B.** Repräsentatives Chromatogramm einer extrahierten Probe auf Anlage II. Eine unbekannte Substanz bei 3,0 min interferiert mit der Quantifizierung von PGD₂.

4.2.5 Ergebnisse der Optimierung

4.2.5.1 LC-MS/MS-Einstellungen Anlage I (API 3000)

Die Bestimmung von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} wurde mit einer Synergi Hydro-RP-Säule (150 mm · 2 mm I.D., 4 µm Partikelgröße und 80 Å Porengröße, Phenomenex, Aschaffenburg) und einer Aqua-C₁₈-Vorsäule (4 mm · 2 mm I.D., 10 µm Partikelgröße und 125 Å Porengröße) durchgeführt. Als mobile Phase A wurde Acetonitril/Wasser (40:60, v/v, pH 6,8) und Acetonitril/Ameisensäure (100:0,1, v/v) als mobile Phase B eingesetzt. Beide mobilen Phasen wurden vor der Verwendung unter Vakuum und Ultraschall entgast. Die Fließgeschwindigkeit betrug während der gesamten Analyse 500 µl/min. Die Säule wurde mit 100 % mobile Phase A equilibriert. Nach der Injektion (t = 0 min) von 20 µl Probe wurden die Ausgangsbedingungen für 0,8 min beibehalten (t = 0,8 min). Innerhalb der nächsten 3,2 min wurde linear auf 100 % mobile Phase B gewechselt (t = 4 min) und die Bedingungen für eine Minute gehalten (t = 5 min). Innerhalb von 0,3 min wurde der Gradient wieder auf 100 % mobile Phase A zurückgefahren (t = 5,3 min) und die Säule unter diesen Bedingungen die nächsten 4,2 Minuten equilibriert (t = 9,5 min). Als Probensolvens wurde Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) verwendet. Die Retentionszeiten betrugen 1,8 min für PGF_{2α}, 2,3 min für PGE₂ und 2,8 min für PGD₂. Für die HPLC und für das Probensolvens wurde Wasser, Acetonitril und Methanol von der Firma J.T.Baker in HPLC-Qualität verwendet.

Das Tandem-Massenspektrometer (API 3000) wurde mit der TurboIonSpray-Quelle im negativen Ionenmodus verwendet. Die Temperatur der Quelle wurde mit Hilfe eines Gas-Flusses von 8,0 l/min (*auxiliary gas*) auf 550°C eingestellt und an der Elektrospray-Nadel eine Spannung von -3400 V angelegt. Die Zerstäubergasgeschwindigkeit (*nebulizer gas*) betrug 1,58 l/min und die Gasvorhangsgeschwindigkeit (*curtain gas*) 1,25 l/min. Die Kollisionszelle enthielt $2,28 \cdot 10^{15}$ Moleküle N₂/cm². Sämtliche Quadrupole arbeiteten unter „low“ Einstellung und im MRM-Modus. Für die Bestimmung von PGF_{2α}, PGE₂, PGD₂, [²H₄]-PGE₂ und [²H₄]-PGD₂ wurden die Massenübergänge aus Tabelle 4-2 verwendet. Jede Ionenspur wurde pro MRM-Zyklus 60 ms lang betrachtet.

Die Orientierung der ESI-Quelle betrug +5 Einheiten in x-Richtung (parallel der Ionenflugbahn) und +4 Einheiten in y-Richtung (rechtwinklig zur Ionenflugbahn).

Analyt	M ₁ m/z	M ₂ m/z	t [ms]	DP [V]	FP [V]	CE [V]	CXP [V]	verwendeter IS
PGE ₂	351,2	→ 271,2	60	-45	-185	-24	-2	[² H ₄]-PGE ₂
	351,2	→ 315,1	60	-45	-185	-17	-1	
PGD ₂	351,3	→ 251,1	60	-51	-170	-14	-7	[² H ₄]-PGD ₂
	351,3	→ 233,0	60	-51	-170	-18	-7	
PGF _{2α}	353,2	→ 309,1	60	-51	-310	-28	-7	[² H ₄]-PGE ₂
	353,2	→ 193,0	60	-51	-310	-34	-3	
[² H ₄]-PGE ₂	355,2	→ 275,2	60	-31	-220	-24	-15	
[² H ₄]-PGD ₂	355,2	→ 237,0	60	-22	-100	-17	-10	

Tabelle 4-2: Massenübergänge und zugehörige Spannungen der MRM-Methode auf Anlage I (API 3000). Für jeden Analyten wurde ein Quantifier (erster Massenübergang) und Qualifier (zweiter Massenübergang) verwendet. Für die beiden internen Standards ist kein zusätzlicher Qualifier notwendig, da beide Substanzen im jeweiligen anderen Massenübergängen ebenfalls miterfasst werden. Abkürzungen: M₁ = m/z der Verbindung, M₂ = m/z des Fragments, t = Messzeit des Massenübergangs, DP = *declustering potential*, FP = *focusing potential*, CE = *collision energy*, CXP = *cell exit potential*, IS = Interner Standard.

4.2.5.2 LC-MS/MS-Einstellungen Anlage II (API 4000)

Die Bestimmung von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} wurde mit einer Synergi Hydro-RP-Säule (150 mm · 2 mm I.D., 4 µm Partikelgröße und 80 Å Porengröße, Phenomenex, Aschaffenburg) und einer Aqua-C₁₈-Vorsäule (4 mm · 2 mm I.D., 10 µm Partikelgröße und 125 Å Porengröße) durchgeführt. Als mobile Phase A wurde Wasser/Ameisensäure (100:0,1, v/v, pH 2,8) und Acetonitril/Ameisensäure (100:0,1, v/v) als mobile Phase B verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug während der gesamten Analyse 500 µl/min. Die Säule wurden mit 60 % mobile Phase A equilibriert und diese Einstellungen nach der Injektion von 20 µl Probe für 0,3 min gehalten (t = 0,3 min). Innerhalb der nächsten 3,2 min wurde der Gradient linear auf 0 % mobile Phase A gefahren (t = 3,5 min) und für eine Minute gehalten (t = 4,0 min). Innerhalb von 0,3 min wurde der Gradient wieder auf die Ausgangsbedingungen von 60 % mobile Phase A zurückgefahren (t = 4,3 min) und die Säule die nächsten 3,7 min erneut equilibriert (t = 8,5 min). Die Retentionszeiten betrugen 2,0 min für PGF_{2α}, 2,5 min für PGE₂ und 2,9 min für PGD₂. Als Probensolvens wurde Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) verwendet. Um das Massenspektrometer nicht unnötig mit Matrix und HPLC-Laufmittel zu belasten, wurde ein Ventil zwischen HPLC-Säule und Massenspektrometer eingesetzt, das nur zwischen t = 0,5 min und t = 6,0 min den HPLC-Fluss in das Massenspektrometer leitete. Für die HPLC und für das Probensolvens wurde Wasser, Acetonitril und Methanol von der Firma Merck in HPLC-Qualität verwendet.

Das Tandem-Massenspektrometer (API 4000) wurde mit der Turbo-V-Spray-ESI-Quelle im negativen Ionenmodus verwendet. Die Temperatur der Quelle wurde mit Hilfe eines Gas-Druckes von 90 psi (GS2) auf 600°C eingestellt und an der Elektrospray-Nadel eine Spannung von -4500 V angelegt. Der Zerstäubergasdruck (GS1) betrug 50 psi und der Gasvorhangsdruck (*curtain gas*) 50 psi. Die Kollisionszelle enthielt $2,78 \cdot 10^{15}$ Moleküle N_2/cm^2 . Sämtliche Quadrupole arbeiteten unter „unit“ Einstellung und im MRM-Modus. Für die Bestimmung der Analyten, dienten die in Tabelle 4-3 aufgeführten Massenübergänge. Jede Ionenspur wurde pro MRM-Zyklus 60 ms lang betrachtet.

Die Orientierung der ESI-Quelle betrug +5 mm in y-Richtung (vertikal) und +5 mm in z-Richtung (horizontal).

Analyt	M_1 m/z	M_2 m/z	t [ms]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]	verwendeter IS
PGE ₂	{ 351,1 → 271,2 351,2 → 189,1	60 60	-46 -46	-5,5 -5,5	-21,5 -24,5	-7 -11		[² H ₄]-PGE ₂
PGD ₂	{ 351,1 → 251,1 351,1 → 233,0	60 60	-46 -46	-5,5 -5,5	-12 -17	-7 -7		[² H ₄]-PGD ₂
PGF _{2α}	{ 353,1 → 309,1 353,1 → 193,0	60 60	-65 -65	-3 -3	-26 -34	-7 -11		[² H ₄]-PGE ₂
[² H ₄]-PGE ₂	355,1 → 275,1	60	-55	-5,5	-17	-5		
[² H ₄]-PGD ₂	355,1 → 237,0	60	-55	-5,5	-24	-7		

Tabelle 4-3: Massenübergänge und zugehörige Spannungen der MRM-Methode auf Anlage II (API 4000). Für jeden Analyten wurde ein Quantifier (erster Massenübergang) und Qualifier (zweiter Massenübergang) verwendet. Für die beiden internen Standards ist kein zusätzlicher Qualifier notwendig, da beide Substanzen im jeweiligen anderen Massenübergängen ebenfalls miterfasst werden. Abkürzungen: $M_1 = m/z$ der Verbindung, $M_2 = m/z$ des Fragments, t = Messzeit des Massenübergangs, DP = *declustering potential*, EP = *entrance potential*, CE = *collision energy*, CXP = *cell exit potential*, IS = Interner Standard.

4.2.5.3 Probenvorbereitung

PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} wurden in einer Konzentration von je 1.000.000 ng/ml in Methanol bei -80°C gelagert. Aus diesen wurde eine methanolische Stammlösung mit je 50.000 ng/ml PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} hergestellt. Diese Stammlösung diente als Ausgangspunkt für die Herstellung des höchsten Standards, von dem ausgehend verschiedene Verdünnungen nach dem Pipettierschema in Tabelle 4-4 hergestellt wurden.

Nr.	End-Konzentration [ng/ml]	effektive Konzentration [ng/ml]	Volumen der Stammlösung [µl]	Konzentration der Stammlösung [ng/ml]	Volumen Methanol [µl]
7	1.000	5.000	50	50.000	450
6	750	3.750	243	5.000	81
5	250	1.250	124	3.750	248
4	100	500	170	1.250	255
3	75	375	222	500	74
2	25	125	94	375	188
1	10	50	80	125	120

Tabelle 4-4: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe. Jeder Standard wurde aus dem vorangegangenen Standard hergestellt. Da 20 µl Standard zu 100 µl Probe pipettiert werden sollen, muss die effektive Konzentration um den Faktor 5 höher sein als die angestrebte Endkonzentration in den Proben.

[²H₄]-PGE₂ wurde in einer Konzentration von 50.000 ng/ml und [²H₄]-PGD₂ in einer Konzentration von 100.000 ng/ml als methanolische Lösungen bei -80°C aufbewahrt. Aus diesen wurde eine Stammlösung der internen Standards mit 10.000 ng/ml [²H₄]-PGE₂ und 5.000 ng/ml [²H₄]-PGD₂ in Methanol hergestellt und diese vor Verwendung zu 500 ng/ml [²H₄]-PGE₂ und 250 ng/ml [²H₄]-PGD₂ mit Methanol/Wasser (1:1, v/v) verdünnt.

Alle Stammlösungen wurden in 1,8 ml Glasfläschchen aufbewahrt und bei -80°C gelagert. Die Standardreihe wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aus Plastik (Sarstedt, Easy Caps) angesetzt, anschließend in 1,8 ml Glasfläschchen mit Mikroeinsätzen umgefüllt und bei -40°C gelagert.

Kalibrationsstandards und Qualitätsstandards wurden mit 100 µl mPGES-1-Assay-Lösung, 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung, 20 µl Standard (50 bis 5.000 ng/ml in Methanol/Wasser (1:1, v/v)), 20 µl interner Standard (500 ng/ml [²H₄]-PGE₂ und 250 ng/ml [²H₄]-PGD₂ in Methanol/Wasser (1:1, v/v)) und 800 µl Wasser in 1,5 ml Reaktionsgefäßen aus Plastik (Sarstedt, Easy Caps) hergestellt, geschüttelt und 1 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Proben des Assays wurden vergleichbar aufbereitet. 100 µl Probe des mPGES-1-Assays wurden direkt nach erfolgter Reaktion mit 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung versetzt und sofort bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden zu den noch gefrorenen Proben 20 µl Methanol/Wasser (1:1, v/v), 20 µl interner Standard (500 ng/ml [²H₄]-PGE₂ und 250 ng/ml [²H₄]-PGD₂ in Methanol/Wasser (1:1, v/v)) und 800 µl Wasser pipettiert, geschüttelt und 1 min bei 10.000 g zentrifugiert.

Für die Festphasenextraktion wurden 1 ml Oasis-HLB-SPE-Kartuschen von Waters verwendet. Diese wurden mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert und mit 1040 µl Probe beladen. Anschließend wurden die Kartuschen mit 1 ml Methanol/Wasser (30:70, v/v) gewaschen und 5 Minuten unter vollem Vakuum getrocknet. Die Analyten wurden anschließend mit 1 ml Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (30:65:5, v/v) von den SPE-Säulen eluiert. Nach der Elution wurde das Lösungsmittel bei 45°C unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockne eingedampft und in 100

µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend 20 Sekunden lang geschüttelt, 2 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und in Glasfläschchen mit 200 µl Mikroeinsätzen umgefüllt.

Während einer Messreihe wurden die Proben im Autosampler der Anlage I (API 3000) bei Raumtemperatur (Kühlung nicht möglich) und im Autosampler der Anlage II (API 4000) bei 2°C gelagert. Sofern die Proben nicht direkt nach der Extraktion gemessen werden konnten, wurden sie bei -80°C eingefroren.

4.2.5.4 Datenauswertung

Die Quantifizierung des mPGES1-Assays erfolgte anhand einer frisch extrahierten Standardreihe. Für die Berechnung der Regression wurde für jeden Analyten das Verhältnis aus seiner Peakfläche und der Peakfläche des zugehörigen internen Standards ermittelt und gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Zur Berechnung der Kalibrationsgerade wurde für jeden Analyten eine quadratische Regressionsanalyse mit einer Gewichtung von $1/\text{Konzentration}^2$ verwendet.

4.3 Methodenvalidierung

4.3.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde mit sechs Standardreihen (10 ng/ml bis 1000 ng/ml) ermittelt, die nach 4.2.5 hergestellt und extrahiert wurden. Anschließend wurden die Proben geteilt und einmal auf Anlage I und auf Anlage II gemessen.

		Richtigkeit					
		Anlage I (API 3000)			Anlage II (API 4000)		
Analyt	Konzentration (ng/ml)	Richtigkeit \pm <i>SD</i> (n = 6)		<i>RSD</i>	Richtigkeit \pm <i>SD</i> (n = 6)		<i>RSD</i>
		(ng/ml)	(%)	(%)	(ng/ml)	(%)	(%)
PGE₂	10	10,0 \pm 0,4	99,7 \pm 4,0	4,0	10,0 \pm 0,3	99,9 \pm 3,1	3,1
	25	25,2 \pm 0,6	100,8 \pm 2,5	2,5	25,2 \pm 1,2	100,8 \pm 4,8	4,8
	75	74,5 \pm 1,3	99,4 \pm 1,9	1,7	74,3 \pm 1,3	99,2 \pm 1,8	1,8
	100	101,6 \pm 1,6	101,6 \pm 1,6	1,6	99,8 \pm 2,5	99,8 \pm 2,5	2,5
	250	246,5 \pm 4,8	98,5 \pm 1,9	2,0	251,5 \pm 10,3	100,6 \pm 4,1	4,1
	750	744,7 \pm 11,9	99,2 \pm 1,5	1,6	749,0 \pm 7,6	99,8 \pm 1,0	1,0
	1000	1007,0 \pm 13,2	100,7 \pm 1,3	1,3	1001,5 \pm 21,0	100,2 \pm 2,1	2,1
	μ		100,0 \pm 2,1	2,1		100,0 \pm 2,8	2,8
PGD₂	10	10,0 \pm 0,5	99,7 \pm 4,8	4,8	10,0 \pm 0,2	100,2 \pm 2,4	2,4
	25	25,2 \pm 0,8	100,8 \pm 3,3	3,1	24,8 \pm 0,7	99,4 \pm 2,9	2,9
	75	75,0 \pm 1,7	100,0 \pm 2,1	2,2	74,7 \pm 1,3	99,6 \pm 1,8	1,8
	100	99,4 \pm 1,7	99,4 \pm 1,7	1,7	100,9 \pm 2,6	100,9 \pm 2,6	2,5
	250	251,3 \pm 9,0	100,6 \pm 3,6	3,6	250,3 \pm 6,8	100,2 \pm 2,9	2,7
	750	738,2 \pm 21,4	98,5 \pm 3,0	2,9	746,3 \pm 15,5	99,4 \pm 1,9	2,1
	1000	1012,3 \pm 19,9	101,2 \pm 2,0	2,0	1001,3 \pm 19,5	100,1 \pm 1,9	1,9
	μ		100,0 \pm 2,9	2,9		100,0 \pm 2,4	2,4
PGF_{2α}	10	9,9 \pm 0,6	99,0 \pm 6,2	6,3	9,9 \pm 0,3	99,3 \pm 3,4	3,4
	25	25,6 \pm 1,3	102,6 \pm 5,1	5,0	25,6 \pm 1,4	102,5 \pm 5,6	5,4
	75	74,3 \pm 3,0	99,0 \pm 4,0	4,0	74,1 \pm 2,7	98,7 \pm 3,5	3,6
	100	100,7 \pm 1,7	100,7 \pm 1,7	1,7	98,0 \pm 2,2	98,0 \pm 2,2	2,3
	250	246,2 \pm 6,7	98,5 \pm 2,7	2,7	256,3 \pm 9,0	102,7 \pm 3,6	3,5
	750	740,8 \pm 18,5	98,9 \pm 2,7	2,5	728,7 \pm 34,9	97,2 \pm 4,7	4,8
	1000	1013,7 \pm 13,0	101,4 \pm 1,3	1,3	1016,0 \pm 24,8	101,6 \pm 2,5	2,4
	μ		100,0 \pm 3,4	3,4		100,0 \pm 3,7	3,6

Tabelle 4-5: Zusammenfassung der Richtigkeit von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} von extrahierten Kalibrationsstandards in mPGES-1-Assay-Lösung. Die Richtigkeit wurde mit 6 Standardreihen bestimmt, die nach 4.2.5 mit 1 ml Oasis-HLB-SPE-Kartuschen extrahiert wurden. Blind- und Doppelblindproben enthielten weder PGE₂, PGD₂ noch PGF_{2 α} . Abkürzungen: μ = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung, *RSD* = relative Standardabweichung.

Für alle Berechnungen wurden die Verhältnisse der Peakflächen der Analyten und der Peakfläche der entsprechenden internen Standards bestimmt. Anschließend wurde für jede Konzentration der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (*SD*) und die relative Standardabweichung (*RSD*) berechnet. Der beste Wert für die Richtigkeit wurde mit einer gewichteten quadratischen Regression und einem

Wichtungsfaktor von $1/\text{Konzentration}^2$ erhalten. Die genauen Werte für jede Konzentration sind in Tabelle 4-5 wiedergegeben und entsprechen alle den Vorgaben der FDA.

4.3.2 Selektivität und Spezifität

Die Bestimmung der Selektivität wurde gleichzeitig mit der Ermittlung der Richtigkeit durchgeführt. Die sechs Doppelblind- und Blindproben zeigten keine Störpeaks bei den zu erwartenden Retentionszeiten der Analyten (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-4).

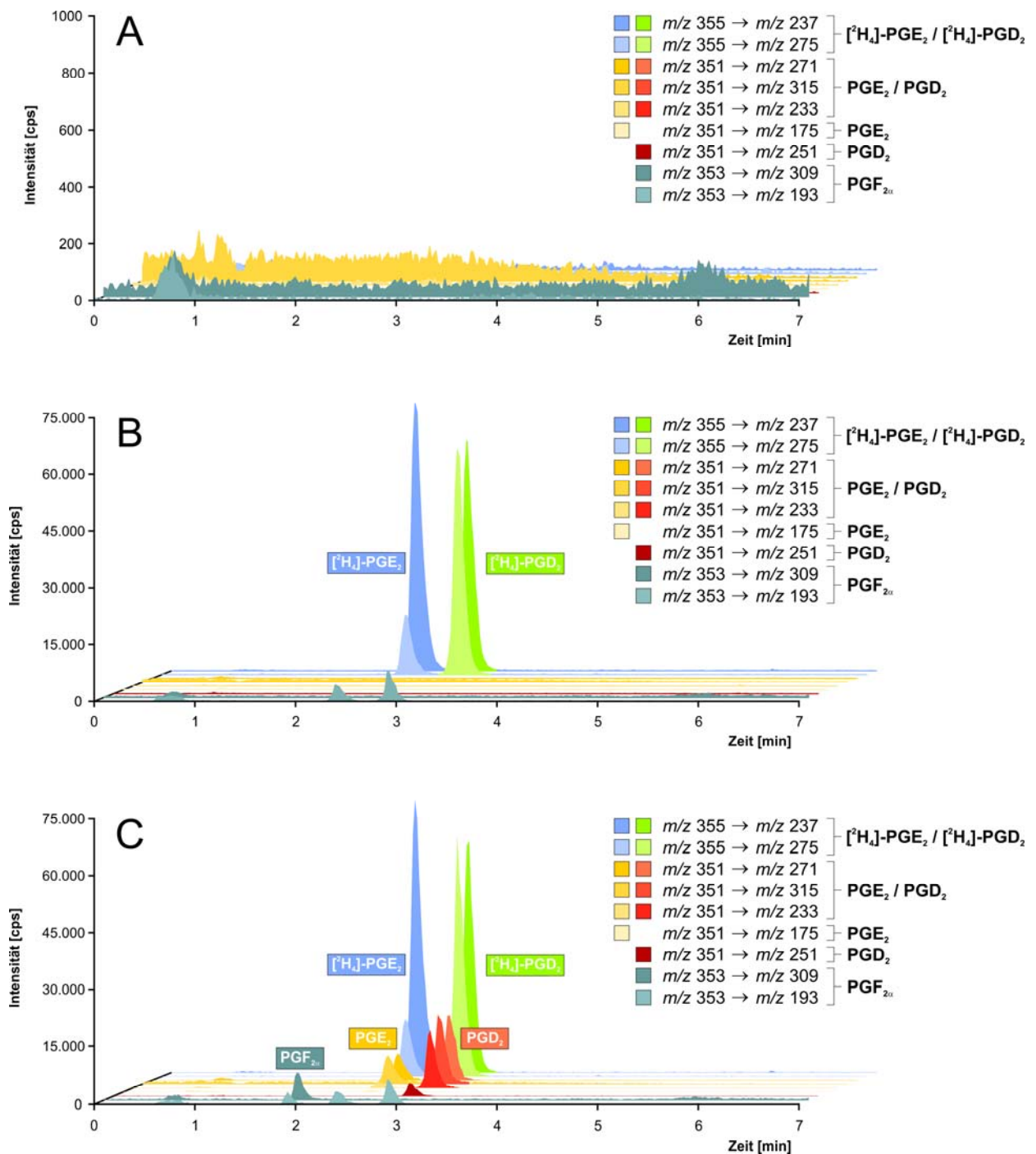


Abbildung 4-3: Selektivität der LC-MS/MS-Methode auf Anlage I (API 3000) für extrahierte Standards in mPGES-1-Assay-Lösung. Chromatogramm A zeigt eine extrahierte Doppelblindprobe, Chromatogramm B eine

Blindprobe und Chromatogramm C einen extrahierten 10 ng/ml Standard. Die Endkonzentration von $[^2\text{H}_4]$ -PGE₂ betrug in den Chromatogrammen B und C 100 ng/ml, die von $[^2\text{H}_4]$ -PGD₂ 50 ng/ml.

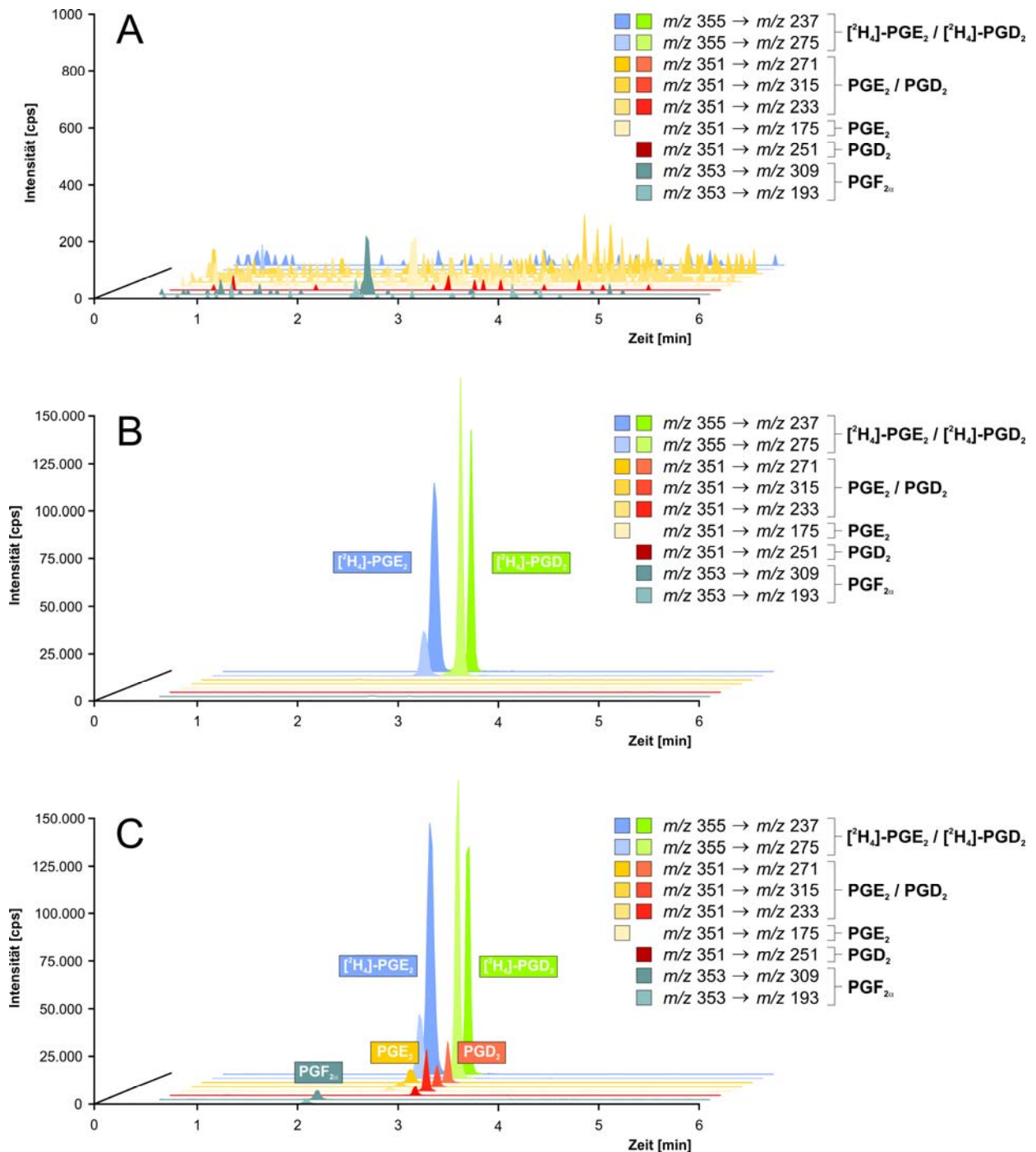


Abbildung 4-4: Selektivität der LC-MS/MS-Methode auf Anlage II (API 4000) für extrahierte Standards in mPGES-1-Assay-Lösung. Chromatogramm A zeigt eine extrahierte Doppelblindprobe, Chromatogramm B eine Blindprobe und Chromatogramm C einen extrahierten 10 ng/ml Standard. Die Endkonzentration von $[^2\text{H}_4]$ -PGE₂ betrug in den Chromatogrammen B und C 100 ng/ml, die von $[^2\text{H}_4]$ -PGD₂ 50 ng/ml.

4.3.3 Präzision

Die Methodenpräzision wurde an vier verschiedenen Tagen mit jeweils 5 Konzentrationen (10, 25, 100, 250 und 1000 ng/ml), Blind- und Doppelblindproben durchgeführt. Blindproben wurden nur mit internem Standard und mPGES-1-Assay-Lösung hergestellt und Doppelblindproben bestanden nur aus mPGES-1-Assay-Lösung. Da die extrahierten Proben aufgrund eines Injektionsvolumens von 20 µl und auf beiden Anlagen gemessen werden sollten, wurde jede Konzentration, Blind- und Doppelblind-Probe 4 Mal angesetzt und extrahiert. Nach dem Abdampfen der organischen Phase wurde der Rückstand mit je 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) versetzt und nach Zentrifugation jeweils zu einer einzigen Probe vereinigt (400 µl pro Konzentration, Blind- und Doppelblindprobe). Anschließend wurden die Proben geteilt und auf Anlage I und auf Anlage II gemessen.

Analyt	Konzentration (ng/ml)	Intraday				Interday			
		Anlage I (API 3000)		Anlage II (API 4000)		Anlage I (API 3000)		Anlage II (API 4000)	
		$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	RSD (%)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	RSD (%)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	RSD (%)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	RSD (%)
PGE ₂	10	100,1 ± 3,1	3,1	100,3 ± 2,3	2,3	100,0 ± 6,2	6,2	100,3 ± 2,1	2,1
	25	99,6 ± 2,8	2,8	98,9 ± 1,3	1,3	99,6 ± 3,3	3,4	98,9 ± 1,9	1,9
	100	101,0 ± 1,3	1,3	101,7 ± 0,5	0,5	101,8 ± 2,4	2,4	101,9 ± 0,8	0,8
	250	99,2 ± 2,1	2,2	99,0 ± 1,3	1,3	98,3 ± 1,6	1,6	98,7 ± 1,1	1,1
	1000	100,0 ± 2,3	2,3	99,9 ± 1,2	1,2	100,1 ± 1,7	1,7	100,1 ± 0,8	0,8
	μ	99,9 ± 2,3	2,3	100,0 ± 1,3	1,3	100,0 ± 3,1	3,1	100,0 ± 1,3	1,3
PGD ₂	10	100,0 ± 6,2	6,2	99,8 ± 2,9	2,9	100,1 ± 6,2	6,1	99,9 ± 3,6	3,6
	25	99,6 ± 3,3	3,4	100,5 ± 3,9	3,9	98,9 ± 3,4	3,5	100,1 ± 2,6	2,6
	100	101,8 ± 2,4	2,4	101,4 ± 3,2	3,2	103,0 ± 2,7	2,6	101,1 ± 1,5	1,5
	250	98,3 ± 1,6	1,6	98,2 ± 2,2	2,3	97,6 ± 1,2	1,2	98,7 ± 1,9	2,0
	1000	100,1 ± 1,7	1,7	100,4 ± 2,1	2,1	100,4 ± 2,0	2,0	100,2 ± 2,5	2,5
	μ	100,0 ± 3,1	3,1	100,1 ± 2,9	2,9	100,0 ± 3,1	3,1	100,0 ± 2,4	2,4
PGF _{2α}	10	100,5 ± 4,2	4,2	99,6 ± 3,4	3,4	100,4 ± 7,9	7,9	99,9 ± 1,8	1,8
	25	98,1 ± 2,2	2,2	100,5 ± 2,4	2,4	98,5 ± 2,2	2,2	99,7 ± 1,7	1,7
	100	102,3 ± 2,3	2,2	101,7 ± 2,1	2,0	102,3 ± 2,6	2,6	101,5 ± 1,2	1,2
	250	98,8 ± 2,1	2,2	97,9 ± 1,2	1,2	98,6 ± 2,5	2,6	98,6 ± 0,8	0,8
	1000	100,1 ± 2,1	2,1	100,3 ± 0,8	0,8	100,1 ± 1,6	1,6	100,1 ± 0,6	0,6
	μ	99,9 ± 2,6	2,6	100,0 ± 2,0	2,0	100,0 ± 3,4	3,4	100,0 ± 1,2	1,2

Tabelle 4-6: Ergebnisse von Intraday- und Interday-Präzision für PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} auf Anlage I (API 3000) und Anlage II (API 4000). Die Endkonzentration von [²H₄]-PGE₂ betrug in allen Versuchen 100 ng/ml, die von [²H₄]-PGD₂ 50 ng/ml. Abkürzungen: μ = Mittelwert, SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung.

Jede vereinigte Probe wurde 6 Mal hintereinander in das LC-MS/MS-System injiziert und die Konzentration von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} bestimmt. Zur Berechnung der Standardreihe wurden die Peakflächenverhältnisse der Analyten zum jeweiligen internen Standard jeder injizierten Probe verwendet. Anschließend wurde für jeden Tag der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) der Peakflächenverhältnisse für jede Konzentration errechnet.

(Tabelle 4-6). Wie bei der Bestimmung der Richtigkeit traten keine Störpeaks in den Blind- und Doppelblindproben bei den zu erwartenden Retentionszeiten aller Analyten auf.

Als Quantifizierungsgrenze der Methode wurde die Konzentration des Analyten festgelegt, wo die Standardabweichung der Richtigkeit und die relative Standardabweichung der Methodenpräzision nicht mehr als 15 % betragen (85 % bis 115 %). Für alle Analyten ergab sich somit eine Quantifizierungsgrenze von 10 ng/ml.

4.3.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung aller Analyten und internen Standards wurde mit vier verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 250 und 1000 ng/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde sechs Mal nach 4.2.5 angesetzt und extrahiert (Ansatz A). Zusätzlich wurden pro Konzentration 6 Doppelblindproben angesetzt und diese nach dem Abdampfen der organischen Phase in je 100 µl Lösungsmittel-Standards in Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen, die die gleiche Stoffmenge an Analyten und internen Standards enthielten wie die extrahierten Standards (Ansatz B).

Zur Bestimmung der relativen Wiederfindung wurde die Peakfläche der extrahierten Proben (Ansatz A) mit der Peakfläche der dotierten Doppelblindproben (Ansatz B) verglichen, die nach dem Abdampfen mit Standard dotiert wurden.

PGE₂ zeigte auf Anlage I eine mittlere relative Wiederfindung von 92,8 % ± 2,4 %, [²H₄]-PGE₂ von 93,5 % ± 1,5 %, PGD₂ von 92,2 % ± 3,2 %, [²H₄]-PGD₂ von 93,8 % ± 2,6 % und PGF_{2α} von 90,4 % ± 3,3 %. Alle Prostaglandine verhielten sich auf Anlage II ähnlich. Die mittlere relative Wiederfindung von PGE₂ auf Anlage II betrug 89,3 % ± 4,3 %, von [²H₄]-PGE₂ 90,0 % ± 4,1 %, von PGD₂ 88,3 % ± 4,2 %, von [²H₄]-PGD₂ 90,3 % ± 5,5 % und von PGF_{2α} 88,3 % ± 5,3 % (Tabelle 4-7).

Dagegen wurde die absolute Wiederfindung durch den Vergleich der Peakflächen der extrahierten Proben (Ansatz A) mit nicht extrahierten Lösungsmittelstandards ermittelt. PGE₂ zeigte auf Anlage I eine mittlere absolute Wiederfindung von 94,2 % ± 2,1 %, [²H₄]-PGE₂ von 94,3 % ± 1,4 %, PGD₂ von 205,6 % ± 7,1 %, [²H₄]-PGD₂ von 198,6 % ± 4,7 % und PGF_{2α} von 90,0 % ± 2,3 %. Auf Anlage II betrug die mittlere relative Wiederfindung von PGE₂ 93,1 % ± 4,4 %, von [²H₄]-PGE₂ 93,8 % ± 5,0 %, von PGD₂ 152,1 % ± 8,3 %, von [²H₄]-PGD₂ 154,3 % ± 8,2 % und von PGF_{2α} 90,3 % ± 4,7 % (Tabelle 4-7).

Mit Ausnahme von PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ verhielten sich die anderen Prostaglandine auf beiden Anlagen nahezu identisch. Das Verhalten von PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ kann durch einen unterschiedlichen Aufbau der beiden Tandem-Massenspektrometer erklärt werden (siehe 4.3.5).

		Relative Wiederfindung		Absolute Wiederfindung	
		Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)	Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)
Analyt	Konzentration (ng/ml)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE_2	10	92,4 \pm 3,3	89,9 \pm 3,2	91,4 \pm 3,3	90,8 \pm 3,0
	25	93,6 \pm 3,0	90,2 \pm 5,2	95,0 \pm 1,4	95,9 \pm 4,8
	250	92,3 \pm 1,6	88,4 \pm 5,5	96,3 \pm 2,7	92,3 \pm 6,0
	1000	92,7 \pm 1,8	88,6 \pm 3,4	94,0 \pm 1,1	93,2 \pm 3,9
	μ	92,8 \pm 2,4	89,3 \pm 4,3	94,2 \pm 2,1	93,1 \pm 4,4
PGD_2	10	89,9 \pm 5,1	85,0 \pm 3,9	212,0 \pm 14,2	150,1 \pm 14,3
	25	92,9 \pm 1,1	89,4 \pm 3,7	206,5 \pm 6,9	150,6 \pm 3,6
	75	94,2 \pm 4,7	89,8 \pm 6,6	195,6 \pm 4,2	159,6 \pm 10,2
	100	91,8 \pm 1,8	89,0 \pm 2,6	208,3 \pm 3,0	148,1 \pm 5,1
	μ	92,2 \pm 3,2	88,3 \pm 4,2	205,6 \pm 7,1	152,1 \pm 8,3
$PGF_{2\alpha}$	10	86,8 \pm 6,1	86,2 \pm 6,7	86,2 \pm 3,3	86,7 \pm 4,6
	25	92,6 \pm 2,7	93,5 \pm 7,4	92,0 \pm 2,3	95,5 \pm 4,9
	75	90,1 \pm 2,5	86,5 \pm 4,5	91,9 \pm 1,5	88,9 \pm 5,5
	1000	92,1 \pm 2,0	87,1 \pm 2,4	89,8 \pm 1,9	90,1 \pm 3,8
	μ	90,4 \pm 3,3	88,3 \pm 5,3	90,0 \pm 2,3	90,3 \pm 4,7
$[^2H_4]-PGE_2$	10	91,7 \pm 1,2	89,7 \pm 2,6	92,2 \pm 0,9	92,7 \pm 3,9
	25	95,1 \pm 2,2	93,1 \pm 5,6	95,7 \pm 1,8	96,9 \pm 4,1
	75	93,9 \pm 0,7	88,1 \pm 5,9	96,2 \pm 0,9	93,2 \pm 6,3
	1000	93,4 \pm 1,9	88,9 \pm 2,3	92,9 \pm 2,0	92,3 \pm 5,6
	μ	93,5 \pm 1,5	90,0 \pm 4,1	94,3 \pm 1,4	93,8 \pm 5,0
$[^2H_4]-PGD_2$	10	91,3 \pm 3,7	88,0 \pm 5,0	206,6 \pm 7,1	150,0 \pm 7,4
	25	93,7 \pm 1,0	90,8 \pm 4,5	196,2 \pm 6,1	148,0 \pm 7,1
	75	94,5 \pm 3,5	91,8 \pm 9,9	186,2 \pm 3,5	161,1 \pm 14,5
	1000	95,7 \pm 2,3	90,5 \pm 2,4	205,2 \pm 2,2	158,0 \pm 3,9
	μ	93,8 \pm 2,6	90,3 \pm 5,5	198,6 \pm 4,7	154,3 \pm 8,2

Tabelle 4-7: Ergebnisse von relativer und absoluter Wiederfindung für die Extraktion von PGE_2 , PGD_2 , $PGF_{2\alpha}$, $[^2H_4]-PGE_2$ und $[^2H_4]-PGD_2$ auf Anlage I (API 3000) und Anlage II (API 4000). Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) \pm Standardabweichung (SD).

4.3.5 Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte

Um Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte zu bestimmen, wurden 36 Doppelblindproben nach 4.2.5 hergestellt und extrahiert. Nach dem Abdampfen wurden die Doppelblindproben mit je 100 μ l Lösungsmittel-Standard in Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen und die Proben geteilt, um sie auf beiden Geräten messen zu können. Der verwendete Lösungsmittelstandard hatte eine Konzentration von 100 ng/ml PGE_2 , 100 ng/ml PGD_2 , 100 ng/ml $PGF_{2\alpha}$, 100 ng/ml $[^2H_4]-PGE_2$ und 50 ng/ml $[^2H_4]-PGD_2$. Die Peakflächen der 36 dotierten Doppelblindproben wurden mit den Peakflächen von 36 matrixfreien Lösungsmittel-Standards der gleichen Stoffmenge verglichen.

Für PGE_2 , $[^2H_4]-PGE_2$ und $PGF_{2\alpha}$ konnte eine minimale Signalverstärkung festgestellt werden. PGD_2 und $[^2H_4]-PGD_2$ zeigten dagegen eine starke Signalverstärkung, die allerdings auf beiden Anlagen unterschiedlich stark ausfiel. Auf Anlage I wurde eine Signalverstärkung von 213,9 % \pm 10,6 % für PGD_2 und 201,3 % \pm 10,2 % für $[^2H_4]-PGD_2$, auf Anlage II jedoch nur noch 159,9 % \pm 8,1 % für

PGD₂ und 155,7 % ± 8,1 % für [²H₄]-PGD₂. Ein Grund für dieses unterschiedliche Verhalten von PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ kann durch den unterschiedlichen Aufbau der ESI-Quelle erklärt werden, durch den nicht nur die Analyten, sondern auch Matrixbestandteile unterschiedlich stark ionisiert werden können. Dies kann einen unterschiedlichen Einfluss der Matrixbestandteile auf die Signalstärke zur Folge haben.

Da sich die gleichen Signal-beeinflussenden Effekte der Matrix sowohl auf die Analyten als auch auf die zugehörigen internen Standards auswirken, gibt es keine Schwierigkeiten bei der Datenauswertung und [²H₄]-PGE₂ kann als interner Standard für PGF_{2α} verwendet werden.

Analyt	Matrixeffekte	
	Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)
	$\mu \pm SD$ (%, n = 36)	$\mu \pm SD$ (%, n = 36)
PGE₂	101,3 ± 11,4	103,3 ± 4,1
PGD₂	213,9 ± 10,6	159,9 ± 8,1
PGF_{2α}	98,7 ± 11,3	102,9 ± 4,2
[²H₄]-PGE₂	101,3 ± 11,3	102,6 ± 4,3
[²H₄]-PGD₂	201,3 ± 10,2	155,7 ± 8,1

Tabelle 4-8: Ergebnisse der Bestimmung von Matrixeffekten für die Extraktion von PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, [²H₄]-PGE₂ und [²H₄]-PGD₂ auf Anlage I (API 3000) und Anlage II (API 4000). Die Konzentration von allen Substanzen betrug 100 ng/ml. Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) ± Standardabweichung (SD).

4.3.6 Stabilität

4.3.6.1 Einfrier-Auftau-Stabilität

Die Einfrier-Auftau-Stabilität von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} wurde mit einer niedrigen und einer hohen Konzentration (50 und 1000 ng/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde 6 Mal in mPGES-I-Assay-Lösung angesetzt und bei -80°C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben für 45 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend wieder bei -80°C eingefroren. Der Zyklus wurde zwei weitere Male wiederholt und die Proben nach dem dritten Auftauen nach 4.2.5 extrahiert und in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen, geteilt und auf beiden Geräten gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Auf beiden Geräten konnten Verluste von etwa 14 % für PGE₂ und PGD₂ festgestellt werden (Tabelle 4-9). PGF_{2α} war unter den Bedingungen stabil.

4.3.6.2 Stabilität über 1 Tag

Die Stabilität unter den Lagerungsbedingungen der Prostaglandine wurde mit einer niedrigen und einer hohen Konzentration (50 und 1000 ng/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde 6 Mal in mPGES-

1-Assay-Lösung angesetzt und bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben nach 4.2.5 extrahiert und in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend geteilt und auf beiden Geräten gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Auf beiden Geräten konnten leichte Verluste an PGE₂ und PGD₂ festgestellt werden (Tabelle 4-9). PGF_{2α} war unter den Bedingungen stabil.

		Einfrier-Auftau-Stabilität		Stabilität über 1 Tag	
		Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)	Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)
Analyt	Konzentration (ng/ml)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE ₂	50	84,4 ± 3,6	90,1 ± 5,8	93,0 ± 1,2	94,6 ± 1,5
	1000	89,0 ± 1,8	87,9 ± 0,9	95,9 ± 1,8	94,3 ± 1,7
	μ	86,7 ± 2,7	89,0 ± 3,4	94,4 ± 1,5	94,5 ± 1,6
PGD ₂	50	85,4 ± 5,0	92,3 ± 2,3	94,5 ± 2,8	100,1 ± 2,5
	1000	88,4 ± 2,6	93,5 ± 2,0	93,0 ± 1,8	96,2 ± 1,6
	μ	86,9 ± 3,8	92,9 ± 2,2	93,8 ± 2,3	98,2 ± 2,1
PGF _{2α}	50	98,9 ± 2,8	102,4 ± 5,4	99,7 ± 2,7	97,1 ± 1,9
	1000	103,2 ± 1,7	100,8 ± 1,9	102,2 ± 3,6	101,2 ± 3,7
	μ	101,0 ± 2,2	101,6 ± 3,7	101,0 ± 3,2	99,2 ± 2,8

Tabelle 4-9: Einfrier-Auftaustabilität und Stabilität über einen Tag von Kalibrationsstandards in mPGES-1-Assay-Lösung.

4.3.6.3 Kurzzeit-Stabilität

Zur Bestimmung der Kurzzeit-Stabilität von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} wurden zwei verschiedene Konzentrationen (50 und 1000 ng/ml) 6 Mal in mPGES-1-Assay-Lösung angesetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Proben nach 4.2.5 extrahiert und in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend geteilt und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Während der Aufarbeitung wurden auf beiden Geräten Verluste von ca. 15 % für PGE₂ und PGD₂ beobachtet (Tabelle 4-10). PGF_{2α} war unter den Bedingungen stabil.

4.3.6.4 Probenstabilität im Autosampler

Zur Bestimmung der Stabilität im Autosampler von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} wurden zwei verschiedene Konzentrationen (50 und 1000 ng/ml) je 6 Mal nach 4.2.5 angesetzt, extrahiert und in 100 µl Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend geteilt und in Glasvials umgefüllt. Anschließend wurden die Proben für 24 h in den jeweiligen Auto-

samplern gelagert. Auf Anlage I wurden die Proben bei Raumtemperatur ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) und auf Anlage II bei $3^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ aufbewahrt und anschließend gegen eine frisch extrahierte Standardreihe gemessen. Während der Lagerung unter den jeweiligen Messbedingungen konnte keine Beeinflussung der Stabilität festgestellt werden (Tabelle 4-10).

Analyt	Konzentration (ng/ml)	Kurzzeitstabilität		Stabilität im Autosampler	
		Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)	Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)
		$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE₂	50	82,8 \pm 1,8	86,2 \pm 2,6	103,0 \pm 3,0	98,3 \pm 1,1
	1000	82,5 \pm 3,7	84,7 \pm 3,9	102,6 \pm 2,7	104,7 \pm 0,8
	μ	82,6 \pm 2,7	85,4 \pm 3,3	102,8 \pm 2,9	101,5 \pm 1,0
PGD₂	50	85,4 \pm 0,7	83,5 \pm 1,3	104,9 \pm 2,6	94,0 \pm 2,3
	1000	87,3 \pm 1,9	84,3 \pm 4,7	101,6 \pm 2,7	104,2 \pm 1,2
	μ	86,4 \pm 1,3	83,9 \pm 3,0	103,2 \pm 2,7	99,1 \pm 1,7
PGF_{2α}	50	101,0 \pm 3,5	99,3 \pm 2,3	104,2 \pm 4,0	102,2 \pm 2,9
	1000	99,4 \pm 2,9	99,0 \pm 2,0	104,2 \pm 1,9	105,5 \pm 2,6
	μ	100,2 \pm 3,2	99,1 \pm 2,1	104,2 \pm 3,0	103,8 \pm 2,8

Tabelle 4-10: Kurzzeit- und Probenstabilität im Autosampler von Kalibrationsstandards in mPGES-1-Assay-Lösung.

4.3.6.5 Stabilität der Stammlösungen

Zur Ermittlung der Stabilität der Stammlösung I (je 50.000 ng/ml PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} in Methanol) und Stammlösung II (10.000 ng/ml [²H₄]-PGE₂ und 5.000 ng/ml PGD₂ in Methanol) unter Raumtemperatur wurde jede Stammlösung je 6 Mal in 1,8 ml Glasvials angesetzt und bei Raumtemperatur ($21 \pm 1^\circ\text{C}$) und normalem Tageslicht gelagert. Nach sechs Stunden wurde jede Stammlösung auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) verdünnt und gegen eine frisch hergestellte Standardreihe von PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} , [²H₄]-PGE₂ und [²H₄]-PGD₂ (5 bis 500 ng/ml) gemessen. 20 μl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Bedingungen hatten keinen Einfluss auf die Konzentration der gemessenen Stammlösungen (Tabelle 4-11).

Analyt	Stabilität der Stammlösungen	
	Anlage I (API 3000)	Anlage II (API 4000)
	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE₂	97,8 ± 6,2	96,1 ± 5,2
PGD₂	101,3 ± 4,3	100,0 ± 5,1
PGF_{2α}	99,9 ± 5,7	98,1 ± 6,3
[²H₄]-PGE₂	102,1 ± 3,9	98,6 ± 4,5
[²H₄]-PGD₂	100,3 ± 4,2	100,3 ± 3,6

Tabelle 4-11: Stabilität der Stammlösung I (50.000 ng/ml PGE₂, 50.000 ng/ml PGD₂ und 50.000 ng/ml PGF_{2α}) und Stammlösung II (10.000 ng/ml [²H₄]-PGE₂ und 5.000 ng/ml [²H₄]-PGD₂). Beide Stammlösungen wurden für die Stabilitätsbestimmung auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) verdünnt.

4.3.7 Ergebnisse der Methodenvvalidierung

Die Selektivität der Methode wurde während der Bestimmung der Richtigkeit und der Präzision mit Blind- und Doppelblindproben bestimmt, in denen keine Interferenzen zur Retentionszeit von PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, [²H₄]-PGE₂ und [²H₄]-PGD₂ auftraten.

Da in Vorversuchen keine Werte unterhalb 30 ng/ml für PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} beobachtet wurden, wurde die Methode nicht für maximale Empfindlichkeit validiert und nur eine Quantifizierungsgrenze von 10 ng/ml angestrebt. Die mittlere Richtigkeit der Methode beträgt auf Anlage I für PGE₂ 100,0 % ± 2,3 %, für PGD₂ 100,0 % ± 3,0 % und für PGF_{2α} 100,0 % ± 3,8 %. Auf Anlage II ergab sich eine mittlere Richtigkeit für PGE₂ von 100,0 % ± 2,9 %, für PGD₂ von 100,0 % ± 2,3 % und für PGF_{2α} von 100,0 % ± 4,1 %. An der Quantifizierungsgrenze von 10 ng/ml ergibt sich auf Anlage I eine mittlere Richtigkeit für PGE₂ von 99,7 % ± 4,0 %, für PGD₂ von 99,7 % ± 4,8 % und für PGF_{2α} von 99,0 % ± 6,2 % und auf Anlage II eine mittlere Richtigkeit für PGE₂ von 99,9 % ± 3,1 %, für PGD₂ von 100,2 % ± 2,4 % und für PGF_{2α} von 99,3 % ± 3,4 %. Sämtliche Daten der Richtigkeit entsprechen den Forderungen der FDA. Dies gilt ebenfalls für die Bestimmung der Intraday- als auch der Interday-Präzision, die im Konzentrationsbereich von 10 ng/ml bis 1000 ng/ml von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} erfüllt werden.

Aus den Ergebnissen der Richtigkeit und Präzision ergibt sich als endgültige Quantifizierungsgrenze der Methode 10 ng/ml für PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α}.

Die mittlere relative Wiederfindung von PGE₂, [²H₄]-PGE₂, PGD₂, [²H₄]-PGD₂ und PGF_{2α} betrug auf beiden Anlagen zwischen 88,3 % und 93,8 %. Die Bestimmung der mittlere absolute Wiederfindung von PGE₂, [²H₄]-PGE₂ und PGF_{2α} ergaben Werte zwischen 90,0 % und 94,3 %. Für PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ wurde auf Anlage I eine mittlere absolute Wiederfindung von 205,6 % ± 7,1 % und 198,6 % ± 4,7 % und auf Anlage II von 152,1 % ± 8,3 % und 154,3 % ± 8,2 % bestimmt, die durch einen Signalverstärkenden Effekt der Matrix auf PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ verursacht wird. Auf Anlage I wurde eine

Signalverstärkung von $213,9 \% \pm 10,6 \%$ für PGD_2 und $201,3 \% \pm 10,2 \%$ für $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$, auf Anlage II $159,9 \% \pm 8,1 \%$ für PGD_2 und $155,7 \% \pm 8,1 \%$ für $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$ beobachtet. Ein Grund für dieses unterschiedliche Verhalten von PGD_2 und $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$ kann durch den unterschiedlichen Bau des Interfaces beider Massenspektrometer erklärt werden. Für PGE_2 , PGD_2 , $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGE}_2$ und $[\text{}^2\text{H}_4]\text{-PGD}_2$ konnte ein minimaler Effekt der Matrix auf die Signalstärke beobachtet werden. Bei allen Analyten werden die Matrixeffekte von den internen Standards kompensiert, so dass es keine Schwierigkeiten bei der Auswertung der Daten gibt.

PGE_2 und PGD_2 verursachten während der Stabilitätsbestimmung einige Probleme. Bei der Ermittlung der Kurzzeit-, Einfrier-Auftau- und der Langzeitstabilität nach 2 Wochen wurden bei einer Lagerungstemperatur von -40°C starke Verluste von PGE_2 und PGD_2 beobachtet. Um diese Probleme zu umgehen, wurden die Proben bei -80°C für maximal 1 Tag eingefroren und am nächsten Tag in gefrorenem Zustand mit internem Standard, Methanol/Wasser (50:50, v/v) und mit Wasser versetzt und sofort extrahiert. Zwar zeigen PGE_2 und PGD_2 während der Bestimmung der Kurzzeit- und Einfrier-Auftau-Stabilität trotz EDTA-Zusatz immer noch einen Verlust von ca. 14-15 %, da aber die Proben nur ein einziges Mal aufgetaut und direkt danach extrahiert werden, betragen die Verluste von PGE_2 und PGD_2 nur 5 % (Stabilität nach 1 Tag). Für $\text{PGF}_{2\alpha}$ konnten während allen Stabilitätstests keine Auffälligkeiten festgestellt werden.

Die LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von PGE_2 , PGD_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im mPGES-1-Aktivitäts-Assay entspricht in allen Validierungsparametern den Forderungen der FDA.

4.4 mPGES-1-Aktivitäts-Assay mit Celecoxib, Rofecoxib, Paracetamol, MK-886, R- und S-Flurbiprofen

Um die Eignung der validierten Methode zu überprüfen, wurden mPGES-1-enthaltende Mikrosomen (Fraktion des endoplasmatischen Retikulums) aus HeLa-Zellen isoliert und nach Jakobssons Protokoll mit PGH₂ und verschiedenen Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurden die Proben nach 4.2.5 extrahiert und die Konzentration von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} mit dem LC-MS/MS-System bestimmt.

Obwohl MK-886 als FLAP- und LTC₄-Synthase-Inhibitor bekannt ist [123,124], blockiert er ebenfalls die mPGES-1 [125]. Dies ist auf die Verwandtschaft der drei Enzyme zurückzuführen, die alle der MAPEG-Familie (engl. *membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism*) angehören und deren katalytisches Zentrum konserviert ist [126].

4.4.1 Reagenzien

4.4.1.1 Mikrosomenfraktion

Die isolierte Mikrosomenfraktion wurde in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (Lösung F) gelöst und auf einen Proteingehalt von 0,2 mg/ml normiert. Die Lösung wurde frisch angesetzt und auf Eis gelagert.

4.4.1.2 Inhibitoren

Celecoxib, Rofecoxib, Paracetamol, MK-886, R- und S-Flurbiprofen wurden in verschiedenen Konzentrationen in DMSO angesetzt.

4.4.1.3 Reaktionspuffer mit PGH₂

56,8 µl PGH₂-Lösung (2 mg/ml in Aceton) und 80 µl 250 mM GSH (Lösung C) werden zu 7863,2 µl auf Eis gekühltem 0,1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 (Lösung F) gegeben. Die Lösung wurde frisch angesetzt und auf Eis gelagert.

4.4.1.4 Stopplösung

8 ml 0,1 M FeCl₂ (Lösung A) wurden mit 0,8 ml 2 M Zitronensäure (Lösung B) versetzt und auf 20 ml mit Wasser (Baker) verdünnt. Die Lösung wurde jeweils frisch angesetzt.

4.4.2 Durchführung

1 µl der verschiedenen Inhibitoren wurde in 96er Mikrotiterplatten pipettiert und mit 50 µl normierter Mikrosomenfraktion (0,2 mg/ml) versetzt. Die Lösung wurde für 30 Minuten auf Eis vorinkubiert und anschließend mit 50 µl Reaktionspuffer versetzt. Nach einer 1 Minute wurde die Reaktion mit 100 µl Stopplösung abgebrochen und überschüssiges PGH₂ in 12-HHT umgewandelt. 100 µl der Proben wurden mit 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung versetzt und anschließend bei -80°C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Proben nach 4.2.5 extrahiert und die Konzentration von PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} mit dem LC-MS/MS-System bestimmt. Als Positivkontrolle wurde 1 µl DMSO ohne

Inhibitor, aber mit Mikrosomen und als Negativkontrolle 1 μ l DMSO ohne Inhibitor und ohne Mikrosomen wie oben inkubiert. Die Positivkontrolle repräsentiert die maximal mögliche PGE₂-Konzentration und die Negativkontrolle die nichtenzymatische Zersetzung von PGH₂ zu PGE₂. Um auszuschließen, dass die Mikrosomen bereits hohe Mengen an PGE₂ enthalten, wurden sie ohne PGH₂ inkubiert. Die Mengen an PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} lagen unter dem Detektionslimit.

4.4.3 Ergebnisse

Für die Berechnung der mPGES-1-Hemmung wurde der Mittelwert der Negativkontrollen von den PGE₂-Konzentrationen der restlichen Proben subtrahiert und der Mittelwert der Positivkontrollen als 100 % gesetzt. Die Mittelwerte der Negativkontrollen lagen in den Versuchen für PGE₂ zwischen 160 und 211 ng/ml. Die maximalen PGE₂-Spiegel (abzüglich der Negativkontrollen), die während der Messungen erreicht wurden, lagen zwischen 457 und 769 ng/ml.

Proben	PGE ₂	PGD ₂	PGF _{2α}
μ der Negativkontrollen	160 ng/ml – 211 ng/ml	53,6 ng/ml – 63 ng/ml	23,2 ng/ml – 42,9 ng/ml
μ der Positivkontrollen	457 ng/ml – 769 ng/ml	-11 ng/ml – 13,5 ng/ml	-12,2 ng/ml – 1,4 ng/ml

Tabelle 4-12: Zusammenfassung der Mittelwerte von Negativ- und Positivkontrollen aus verschiedenen Assay-Ansätzen. Für die Berechnung der Mittelwerte der Positivkontrollen wurde der Mittelwert der Negativkontrollen subtrahiert. Abkürzungen: μ = Mittelwert.

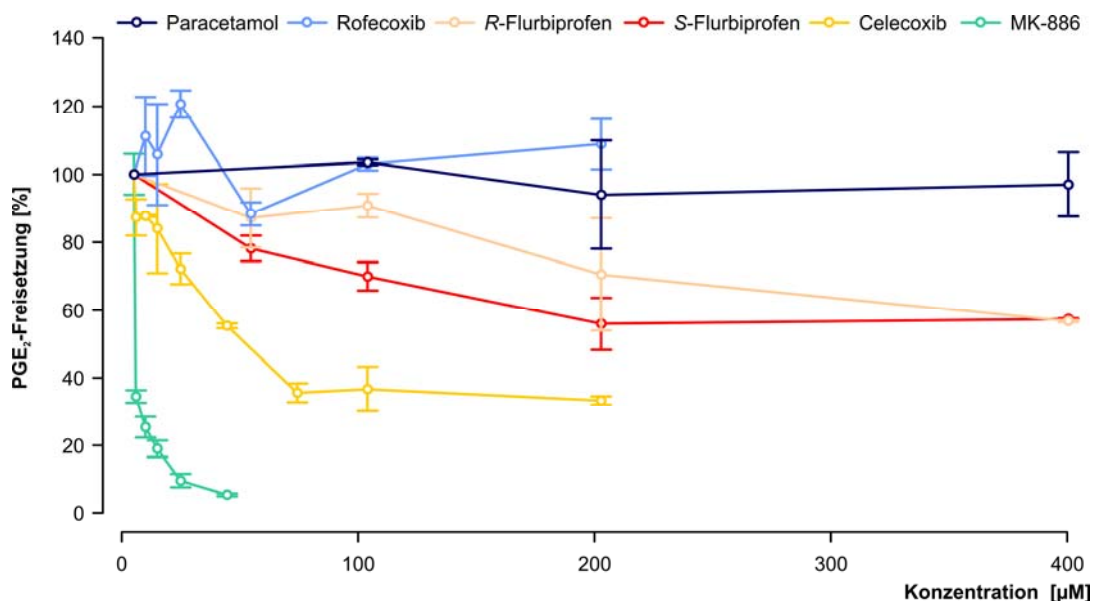


Abbildung 4-5: Einfluss von Paracetamol, Rofecoxib, R-Flurbiprofen, S-Flurbiprofen, Celecoxib und MK-886 auf mPGE-Synthase-1 (n = 2). Die PGE₂-Freisetzung ist proportional zur mPGES-1-Aktivität.

Wie in Literaturdaten bereits beschrieben wurde, ist MK-886 ein sehr potenter Inhibitor der mPGES-1 [125], was in dem durchgeführten mPGES-1-Assay bestätigt werden konnte. Für COX-Inhibitoren sind bisher keine ausführlichen Daten für eine Hemmung der mPGES-1 bekannt, jedoch geht aus dem Assay hervor, dass Paracetamol und Rofecoxib in physiologischen Konzentrationen die mPGES-1-Funktion nicht blockieren und Celecoxib, *R*- und *S*-Flurbiprofen bei hohen Konzentrationen zusätzlich zu ihrer COX-2-Hemmung auch Inhibitoren der mPGES-1 sind. Da Celecoxib ab einer Konzentration von 100 μM , keine weitere Hemmung der mPGES-1 hervorrufen kann, liegt die Bindungsstelle von Celecoxib wahrscheinlich nicht im aktiven Zentrum der mPGES-1 und hemmt die mPGES-1 wohl nicht kompetitiv.

Die Auswertung der Daten für PGD_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ brachte keine Ergebnisse, da die Positivkontrollen kaum von den Negativkontrollen abweichen und aufgrund dessen auch negative Werte für die Positivkontrollen (abzüglich Negativkontrollen) resultieren (Tabelle 4-12).

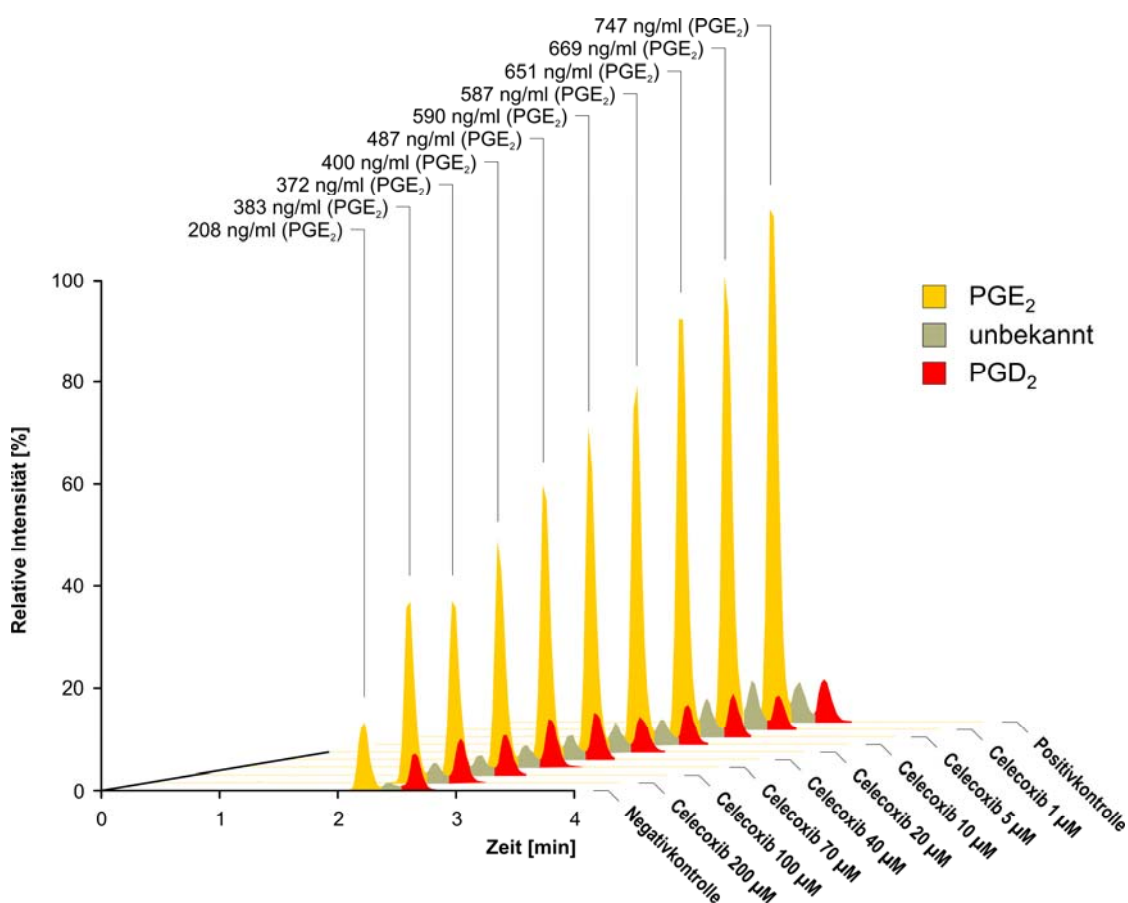


Abbildung 4-6: PGE_2 -Chromatogramme zur Hemmung der mPGES-1 mit Celecoxib (m/z 351 \rightarrow m/z 271). Die PGE_2 -Freisetzung ist proportional zur mPGES-1-Aktivität.

In allen untersuchten Assay-Proben betrug die Fläche des beobachteten Störpeaks zwischen PGE_2 und PGD_2 $11,9 \pm 2,9$ % der Peakfläche von PGE_2 , was darauf schließen lässt, dass der Störpeak neben PGE_2 entweder ein zweites Reaktionsprodukt zwischen PGH_2 und mPGES-1 darstellt, durch ein zwei-

tes Enzym aus PGH₂ oder aus unsauberem PGH₂ gebildet wird. Da der Störpeak auch in den Negativproben vorhanden ist, findet die Reaktion sowohl enzymkatalysiert als auch nicht enzymatisch statt. Um den Störpeak näher zu charakterisieren, wurden verschiedene Isomere von PGE₂ und PGD₂ in einer Konzentration von 100 ng/ml Methanol/Wasser/Ameisensäure (50:50:0,1, v/v, pH 3,2) in das LC-MS/MS-System der Anlage II injiziert (Abbildung 4-7 A). Allerdings wurden nicht die Massenübergänge der validierten Methode verwendet, sondern alle in Anhang II gelisteten Übergänge von PGE₂, PGD₂ und ein Übergang von PGH₂ mit m/z 351 \rightarrow m/z 289. Die Retentionszeiten der injizierten Standards wurden mit der des Störpeaks einer extrahierten Positivkontrolle verglichen (2,81 min). Als Kandidaten wurden Δ^{12} -PGD₂ (2,76 min), 5-trans-PGE₂ (2,81 min) und 11 β -PGE₂ (2,83 min) identifiziert. Anschließend wurden die Chromatogramme auf die Peakhöhe des Störpeaks normiert und das Farbmuster der 15 Massenübergänge zur Identifizierung verwendet (Fingerprint). Nur bei 5-trans-PGE₂ stimmt das Farbmuster und die Retentionszeit exakt mit dem des Störpeaks überein (Abbildung 4-7 B), so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Störpeak 5-trans-PGE₂ ist. Auf welche Weise 5-trans-PGE₂ während der Inkubation entsteht, ist unklar. Da es jedoch immer zum gleichen Prozentsatz wie PGE₂ gebildet wird, kann ausgeschlossen werden, dass es bereits als Verunreinigung in PGH₂ enthalten, sondern muss erst bei einer Enzymreaktion entstanden ist. Entweder entsteht 5-trans-PGE₂ als Nebenprodukt bei der Reaktion von PGH₂ mit mPGES-1, durch ein anderes Enzym, durch nichtenzymatische Umsetzung oder das PGH₂ ist mit etwa 12 % 5-trans-PGH₂ verunreinigt. Ein Vorhandensein von 5-trans-PGH₂, welches eventuell die gleiche Retentionszeit wie PGH₂ selbst besitzt, kann ausgeschlossen werden, da beim Zerfall von PGH₂ in PBS nur die Bildung von PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α} und 12-HHT, aber weder 5-trans-PGE₂ noch 5-trans-PGD₂ beobachtet wurde (Abbildung 4-1). Es muss somit davon ausgegangen werden, dass 5-trans-PGE₂ als Sekundärprodukt der mPGES-1 oder durch ein anderes Enzym der Mikrosomenfraktion entsteht.

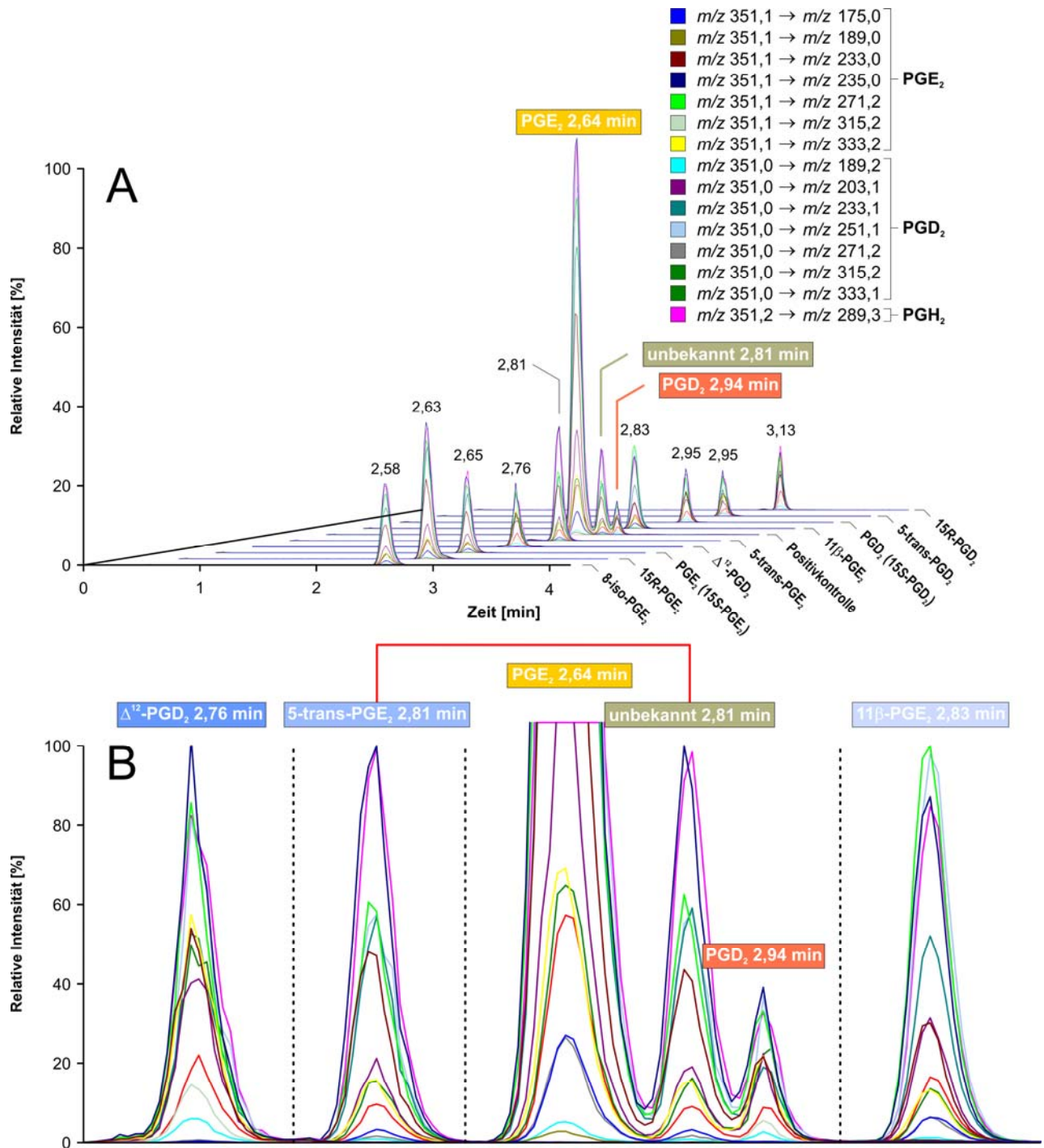


Abbildung 4-7: Retentionszeiten verschiedener PGE₂- und PGD₂-Isomere mit der Molekularmasse von 352,5 im Vergleich zu einer extrahierten Positivkontrolle. **A.** Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 100 ng/ml in Anlage II injiziert. Als Massenübergänge wurden nicht die der validierten Methode verwendet, sondern alle in Anhang II gelisteten für PGE₂ und PGD₂ und der Massenübergang m/z 351 → m/z 289 für PGH₂, der allerdings nicht spezifisch ist. **B.** Fingerprint des zu identifizierenden Störpeaks und der drei Kandidaten. Der Störpeak stimmt im Farbmuster und Retentionszeit exakt mit 5-trans-PGE₂ überein.

4.5 Diskussion und Zusammenfassung

Der von Jakobsson und Thoren entwickelte mPGES-1-Aktivitäts-Assay verwendet zur Bestimmung des Reaktionsproduktes (PGE₂) UV-HPLC, die jedoch eine Laufzeit von 40 Minuten benötigt. Für die Bestimmung eines kompletten Assays (96er Mikrotiterplatte) mit Qualitätskontrollen werden so 80 bis 90 Stunden benötigt. Um PGE₂ in den Proben spezifischer bestimmen zu können und den Proben-durchsatz zu erhöhen, sollte der Assay auf zwei LC-MS/MS-Systeme (Anlage I und Anlage II) übertragen werden, um die vorhandenen Massenspektrometer optimal auszunutzen.

Als Basis für die Methodenentwicklung wurde die LC-MS/MS-Methode aus Kapitel 3 verwendet. In Vorversuchen konnte allerdings sehr schnell festgestellt werden, dass im Gegensatz zur Mikrodialyse-Methode nicht maximale Sensitivität sondern Selektivität gefordert ist, denn in Vorversuchen wurde ein Störpeak zwischen PGE₂ und PGD₂ festgestellt, der bei der Verwendung des Massenübergangs m/z 351 \rightarrow m/z 271 eine Quantifizierung von PGE₂ und PGD₂ unmöglich machte. Um dieses Problem zu lösen, wäre bei normaler UV-HPLC eine Verlängerung der Analysenzeit nötig gewesen. Im Fall von LC-MS/MS reichte es aus, Ameisensäure dem HPLC-Laufmittel zuzusetzen und PGE₂ und PGD₂ unter isokratischen Bedingungen zu trennen. Damit wurde zwar an Empfindlichkeit eingebüßt, aber PGE₂ vom Störpeak abgetrennt. Um auch noch PGD₂ sauber quantifizieren zu können wurde die PGD₂-Detektion auf den selektiven Massenübergang m/z 351 \rightarrow m/z 251 umgestellt, in dem der Störpeak nicht sichtbar war. Durch den Zusatz von Ameisensäure in einer Konzentration von 0,1 % (v/v) und durch die Verwendung eines selektiven Übergangs, konnte der Störpeak ohne eine Verlängerung der Analysenzeit von den beiden Analyten PGE₂ und PGD₂ abgetrennt werden.

In den Vorversuchen wurde zwar neben den drei Prostaglandinen PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} auch TXB₂ detektiert, jedoch lag dessen Konzentration unterhalb 1 ng/ml und unter dem Quantifizierungslimit. Das Quantifizierungslimit der Methode hätte zwar auch durch Änderung des Injektionsvolumens und Modifizierung der HPLC nach unten verschoben werden können, jedoch wären die Signale an PGE₂ so hoch gewesen (Intensität $> 2 \cdot 10^6$ cps), dass ein erhöhter Verschleiß der Detektoreinheit die Folge gewesen wäre. Zudem arbeitet der Detektor des Massenspektrometers bei solch hohen Signalen nicht mehr linear und bei hohen PGE₂-Konzentrationen muss deshalb mit größeren Standardabweichungen gerechnet werden. Aus diesen Gründen, wurde die Methode nach FDA-Kriterien nur für PGE₂, PGD₂ und PGF_{2 α} validiert. Während der Methodenentwicklung wurden Stabilitätsprobleme beim Einfrieren der Proben beobachtet, die durch den Zusatz von EDTA nach Fertigstellung eines Assays behoben werden konnten.

Um die endgültig validierte Methode zu überprüfen, wurde die Mikrosomenfraktion von HeLa-Zellen (Proteingehalt 0,2 mg/ml) mit PGH₂ und verschiedenen Inhibitoren inkubiert. In der Literatur wird MK-886 als sehr potenter Inhibitor der mPGES-1 beschrieben, was in den durchgeführten Assays auch bestätigt werden konnte. Zusätzlich wurden auch noch andere COX-Inhibitoren auf eine mögliche mPGES-1-Hemmung untersucht. In dem validierten System zeigten Rofecoxib und Paracetamol keine

Hemmung der mPGES-1, jedoch Celecoxib, *R*- und *S*-Flurbiprofen. Zwar wurde die Methode auch für PGD₂ und PGF_{2α} validiert, jedoch gab es keine Unterschiede in den PGD₂- und PGF_{2α}-Konzentrationen zwischen den Positiv- und Negativkontrollen.

Durch den Umstieg von HPLC auf ein LC-MS/MS-System konnte die Analysenzeit eines kompletten Assays von 90 Stunden auf 25 Stunden reduziert werden. Zudem wurde zunächst eine unbekannte Substanz detektiert, die in Jakobssons Versuchen nicht beschrieben wurde. Diese Verbindung wurde in allen Versuchen im Verhältnis 1:9 zu PGE₂ gebildet (Vergleich über die Peakfläche). Als Struktur wurde ein Stereoisomer von PGE₂ oder PGD₂ vermutet, worauf verschiedene Isomere von PGE₂ und PGD₂ getestet wurden, ob diese die gleiche Retentionszeit besitzen und in einem Fingerprint mit der gesuchten Verbindung übereinstimmen. 5-trans-PGE₂ hatte exakt die gleiche Retentionszeit und lieferte den gleichen Fingerprint. PGH₂ war weder mit 5-trans-PGE₂ noch mit 5-trans-PGH₂ verunreinigt, was mit einem Abbau des PGH₂ zu PGE₂ und PGD₂ in PBS bei 40°C überprüft wurde. Bei einem Vorhandensein von 5-trans-PGH₂, was eventuell die gleiche Retentionszeit wie PGH₂ selbst besitzt, müsste in einem Puffer bei pH 7,4 5-trans-PGE₂ und 5-trans-PGD₂ entstehen, die aber während des Abbaus von PGH₂ nicht detektiert werden konnten. Dies weist darauf hin, dass 5-trans-PGE₂ entweder ein zweites Produkt der mPGES-1 ist oder durch ein anderes Enzym in den Ansätzen entsteht. Die Daten weisen somit darauf hin, dass PGE₂ nicht das einzige Produkt ist, was durch mPGES-1 gebildet wird. Gegen das Vorhandensein eines zweiten Enzyms spricht die Proportionalität der Peakfläche von 5-trans-PGE₂ zu PGE₂. Wenn 5-trans-PGE₂ nämlich durch ein anderes Enzym gebildet wird, so müsste dieses ebenfalls durch Celecoxib, *R*- und *S*-Flurbiprofen hemmbar sein. Zwar wurde die Methode nicht für 5-trans-PGE₂ validiert, da zu diesem Zeitpunkt der Störpeak noch nicht identifiziert war, allerdings kann davon ausgegangen werden, dass 5-trans-PGE₂ genauso gut aus den mPGES-1-Proben extrahiert wird wie PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α}.

5. Bestimmung von Prostaglandinen und Thromboxan B₂ aus Humanplasma nach LPS-Stimulation

5.1 Zielsetzung

Obwohl die COX-1 schon seit mehreren Jahrzehnten bekannt ist, wurde die induzierbare COX-2 erst 1990 nach einer LPS-Stimulation von Monozyten entdeckt [127,128]. Lange Zeit wurde die COX-1-Hemmung für die Nebenwirkungen von NSAIDs verantwortlich gemacht und deswegen entwickelte Patrignani *in vitro*- und *ex vivo*-Assays, um die COX-2-Aktivität in Plasma zu bestimmen [129]. Die Methoden waren auch dazu geeignet, um Substanzen für eine selektive COX-2-Hemmung zu finden und dadurch das Nebenwirkungspotential von NSAIDs zu minimieren.

Einer dieser *ex-vivo*-Assays basiert auf der Verwendung von humanem Vollblut, dass zusammen mit Acetylsalicylsäure und LPS für 24 Stunden inkubiert wird. Anschließend wird die PGE₂-Konzentration im Plasma bestimmt. Durch die Zugabe von verschiedenen Inhibitoren vermindert sich die PGE₂-Produktion, wodurch das Hemmpotential der COX-2-Inhibitoren bestimmt werden kann. Die Zugabe von Acetylsalicylsäure ist in den Assays notwendig, um Effekte der COX-1 auszuschließen. Die PGE₂-Messungen wurden mit selbst entwickelten Immunoassays durchgeführt.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden mit 10 µg/ml LPS wurden PGE₂-Konzentrationen zwischen 15 und 20 ng/ml im Plasma gefunden. Da Patrignanis Assays auf einem PGE₂-Immunoassay basieren, sollte eine LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, mit der die Primärprostaglandine PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} und das Thromboxan TXB₂ selektiv und sensitiv in Humanplasma bestimmt werden können. Außerdem sollte die Methode so empfindlich sein, dass damit auch physiologische Konzentrationen von Prostaglandinen in Humanplasma ohne LPS-Stimulation bestimmt werden können. Im Humanplasma wurden mit GC-MS Plasmakonzentrationen für PGE₂ von 2-10,4 pg/ml, für TXB₂ von 3-45,3, für PGF_{2α} von 2,2-10,8 pg/ml und für 6-keto-PGF_{1α} von 0,6-1,8 pg/ml beschrieben [130]. Für die LC-MS/MS-Methode wurde aufgrund der besseren Sensitivität Anlage II ausgewählt.

5.2 Methodenentwicklung

5.2.1 Optimierung der massenspektrometrischen Bedingungen

Da bereits sämtliche Prostaglandine im vorherigen Kapitel auf Anlage II optimiert wurden, war eine Anpassung der massenspektrometrischen Bedingungen nicht mehr notwendig.

5.2.2 Optimierung der chromatographischen Bedingungen

Eine Übertragung der sensitiven LC-MS/MS-Methode aus Abschnitt 3 auf das neue API 4000 war aus verschiedenen Gründen nicht möglich (siehe Kapitel 4.2.2). Da PGE₂ und PGD₂ mit sauren Acetonitril/Wasser-Mischungen getrennt werden müssen, konnte im Gegensatz zu Kapitel 3 kein Methanol

mehr als mobile Phase B eingesetzt werden, da auf Anlage II nur 2 Kanäle (A: Wasser, B: Acetonitril) gleichzeitig verwendet werden können. Aus diesem Grund musste der Gradient aus Abschnitt 3 abgeändert werden (Tabelle 5-1). Um eine Trennung von PGE₂ und PGD₂ zu erreichen, wurde als mobile Phase A Wasser und als mobile Phase B Acetonitril und als Probensolvens Methanol/Wasser/Ameisensäure (25:75:0,1, v/v, pH 2,8) verwendet. Das Injektionsvolumen betrug 35 µl.

Zeitpunkt	Mobile Phase A	Mobile Phase B
0 min	60 %	40 %
0,3 min	60 %	40 %
3,5 min	0 %	100 %
4,5 min	0 %	100 %
4,8 min	60 %	40 %
8,5 min	60 %	40 %

Tabelle 5-1: Gradientenzusammensetzung I. Als mobile Phase A wurde Wasser und als mobile Phase B Acetonitril verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 500 µl/min und das Injektionsvolumen 35 µl.

Im Verlauf der Optimierung der Extraktionsmethode (Festphasenextraktion) wurden Störpeaks beobachtet, was eine Änderung der HPLC-Methode erforderte. Eine Verlängerung der HPLC-Methode ging leider mit einem Verlust der Trennung von PGE₂ und PGD₂ einher, da der Ameisensäurezusatz im Probensolvens nur eine Trennung der beiden Prostaglandine bis zu einer Retentionszeit von ca. 3 Minuten ermöglicht. Folglich musste Ameisensäure der mobilen Phase zugesetzt (Tabelle 5-2) und ein Empfindlichkeitsverlust in Kauf genommen werden.

Zeitpunkt	Mobile Phase A	Mobile Phase B
0 min	90%	10%
1 min	90%	10%
2 min	60%	40%
3 min	60%	40%
4 min	50%	50%
6 min	50%	50%
8 min	10%	90%
9 min	10%	90%
10 min	90%	10%
16 min	90%	10%

Tabelle 5-2: Gradientenzusammensetzung II. Als mobile Phase A wurde Wasser/Ameisensäure (100:0,0025, v/v, pH 4,0) und als mobile Phase B Acetonitril/Ameisensäure (100:0,0025, v/v) verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 300 µl/min.

5.2.3 Optimierung der Aufarbeitung

Obwohl bei der entwickelten Methode aus Kapitel 4 bereits eine Extraktionsmethode mit guter Wiederfindung für Prostaglandine entwickelt wurde, war diese nicht für die Extraktion aus Humanplasma geeignet. Für diese Versuche wurden 250 µl Humanplasma, das 10 ng/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂ enthielt, mit 40 µl Methanol und 700 µl Wasser versetzt und nach der bestehenden

Methode aus Kapitel 4 mit 1 ml Oasis-HLB-Kartuschen extrahiert. Die Proben wurden nach dem Abdampfen in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen und 45 µl auf Anlage II injiziert. Die relative und absolute Wiederfindung betrug für alle 5 Prostaglandine < 50 %.

Um eine bessere Wiederfindung zu erreichen, wurden 1 ml C₈- und C₁₈-Kartuschen verschiedener Hersteller (Waters, Varian, Macherey-Nagel, Supelco) mit verschiedenen Elutionsmitteln (Methanol, Acetonitril, Aceton, Isopropanol, Tetrahydrofuran, Ether, Ethylacetat, Chloroform, Dichlormethan und Hexan) getestet. Die Säulen wurden mit je 2 ml Methanol und 2 ml Wasser konditioniert. Anschließend wurden die Proben aufgegeben (250 µl Humanplasma mit 10 ng/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α} und TXB₂, 40 µl Methanol und 700 µl Wasser), mit 1 ml Methanol/Wasser (20:80, v/v) gewaschen und 10 Minuten unter vollem Vakuum getrocknet. Die Proben wurden anschließend mit dem entsprechenden Elutionsmittel eluiert, bei 45°C unter Stickstoff abgedampft und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen. 45 µl der Proben wurden auf Anlage II injiziert. Die relative und absolute Wiederfindung von C₁₈-Kartuschen war mit denen der Oasis-HLB-Kartuschen vergleichbar (alle 5 Prostaglandine < 50 %). C₈-Säulen zeigten zwar eine gute relative Wiederfindung (alle 5 Prostaglandine > 80 %) aber ebenfalls nur eine absolute Wiederfindung von < 50 %. Aufgrund von zahlreichen Störpeaks und des hohen Lösungsmittelverbrauchs von C₈- und C₁₈-Kartuschen (Konditionierung mit jeweils 2 ml organischem und 2 ml wässrigem Lösungsmittel), wurde die Extraktion auf neueren Materialien bevorzugt. Verglichen wurde daraufhin Oasis-HLB-Material mit Varian absolut-Nexus, Macherey-Nagel Easy und den Ionenaustauschern Oasis-MAX und Phenomenex Screen-A. Die Prostaglandine wurden von den Ionenaustauschern mit einem Zusatz von 2 % Ameisensäure zu den verschiedenen Elutionsmitteln eluiert.

Als am besten geeignete Extraktionskartuschen wurden 1 ml Varian absolut-Nexus-Kartuschen ausgewählt, da bei ihnen die wenigsten Störpeaks auftraten und die Wiederfindung von PGE₂, PGD₂ und TXB₂ mit ca. 60 % am höchsten war. Die Wiederfindung von 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} lag allerdings immer noch unterhalb 50 %.

Um die Wiederfindung noch weiter zu erhöhen wurde das Plasma mit Phosphorsäure angesäuert und die Waschschritte modifiziert. Während den Vorversuchen wurden erneut leichte Stabilitätsprobleme der Prostaglandine festgestellt, weshalb den Proben BHT und EDTA zugesetzt und in der Extraktion berücksichtigt werden musste. 250 µl Humanplasma wurden mit 20 µl Standard in Methanol, 20 µl interner Standard-Lösung in Methanol, 10 µl BHT (2 mg/ml in Methanol), 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung und 600 µl 45 mM Phosphorsäure versetzt. Unter diesen Bedingungen wurde eine relative Wiederfindung von ca. 80 % für PGE₂, PGD₂ und TXB₂ und ca. 60 % für 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} ermittelt.

Um Störpeaks von den absolut-Nexus-Kartuschen zu entfernen, wurden die Säulen zusätzlich mit 2 ml Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (30:65:5, v/v) gewaschen und für 20 Sekunden unter vollem Vakuum getrocknet. Die Säulen wurden dann mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert und mit 1000

µl der aufbereiteten Proben beladen. Anschließend wurden die Kartuschen mit 1 ml Wasser und 1 ml Methanol/Wasser (40:60, v/v) gewaschen und 7 Minuten unter vollem Vakuum getrocknet. Die Analyten wurden anschließend mit 1 ml Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (30:65:5, v/v) von den SPE-Säulen eluiert und das Lösungsmittel bei 45°C unter Stickstoff abgedampft und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen. Die in Probensolvens aufgenommenen Proben wurden anschließend 20 Sekunden lang geschüttelt, 2 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und in Glasfläschchen mit Mikroeinsätzen umgefüllt.

5.2.4 Vorversuche

Zunächst wurde Humanplasma des Blutspendedienstes Hessen (Frankfurt) für die Entwicklung der Extraktionsmethode verwendet. Dieses Humanplasma war allerdings nicht für eine Methodenentwicklung und -validierung geeignet, da die Plasmen extrem hohe Mengen an PGE₂, PGD₂ und PGF_{2α} enthielten (Abbildung 5-1 A und B): PGE₂ 11,8 ± 7,8 ng/ml, PGD₂ 2,6 ± 1,7 ng/ml und PGF_{2α} 15,2 ± 2,0 ng/ml (n = 3). Die Konzentration von TXB₂ betrug 0,12 ± 0,07 ng/ml und 6-keto-PGF_{1α} war nur in einem Plasma mit 0,31 ng/ml vertreten. In 6 frisch gewonnenen humanen Heparin-Plasmen (3 männliche und 3 weibliche Plasmen) betrugen die Konzentrationen von PGE₂ 0,008 ± 0,006 ng/ml, von PGD₂ 0,007 ± 0,003 ng/ml, von TXB₂ 0,058 ± 0,026 ng/ml und von 6-keto-PGF_{1α} 0,125 ± 0,110 ng/ml. PGF_{2α} konnte in keinem der 6 Plasmen detektiert werden. Um die Prostaglandinkonzentrationen in den verschiedenen Plasmen des Blutspendedienstes zu bestimmen, wurde eine Standardreihe in PBS angesetzt und genauso behandelt und extrahiert wie die Humanplasmen (siehe unter 5.2.5).

Da Prostaglandine permanent im Humanplasma vorkommen, gibt es nur zwei Möglichkeiten, um die in ihm enthaltenen Prostaglandine zu bestimmen. Zum einen sind dies das Standardadditionsverfahren und zum anderen die Verwendung von Prostaglandin-freien Matrices für die Herstellung der Kalibrationsstandards, die sich während der Extraktion genauso verhalten wie Humanplasma. Da die Standardaddition ein Extrapolationsverfahren darstellt, ist es schwierig Prostaglandine am unteren Ende der Standardreihe mit hinreichender Richtigkeit und Präzision zu bestimmen. Um diesen Fehler zu vermeiden und eine möglichst niedrige Quantifizierungsgrenze zu erreichen, wurde PBS als Plasmaersatz verwendet, das keine Prostaglandine enthält. Um die Richtigkeit der Ergebnisse mit PBS zu gewährleisten, wurde eine Standardreihe in PBS extrahiert und mit einer Standardreihe in frisch gewonnenem Humanplasma verglichen (Abbildung 5-1 C). Die Standardreihen aus PBS und Humanplasma liegen fast aufeinander, so dass PBS als Ersatz für Humanplasma verwendet werden kann. Die Differenz zwischen PBS und dem Humanplasma betrug bei einer Konzentration von 100 ng/ml für PGE₂ -3,8 %, für PGD₂ -2,9 %, für TXB₂ -1,1 %, für PGF_{2α} +3,4 % und für 6-keto-PGF_{1α} -2,3%.

Während den Vorversuchen zur Stabilität wurde bei der Kurzzeitstabilität Verluste von 30 % PGE₂, PGD₂ und TXB₂ nach 4 Stunden beobachtet. Diese wurde durch den Zusatz von 100 µl 0,15 M

EDTA-Lösung und 10 µl BHT (2 mg/ml in Methanol) für PGE₂ und TXB₂ kompensiert und die Verluste von PGD₂ auf etwa 15 % reduziert werden.

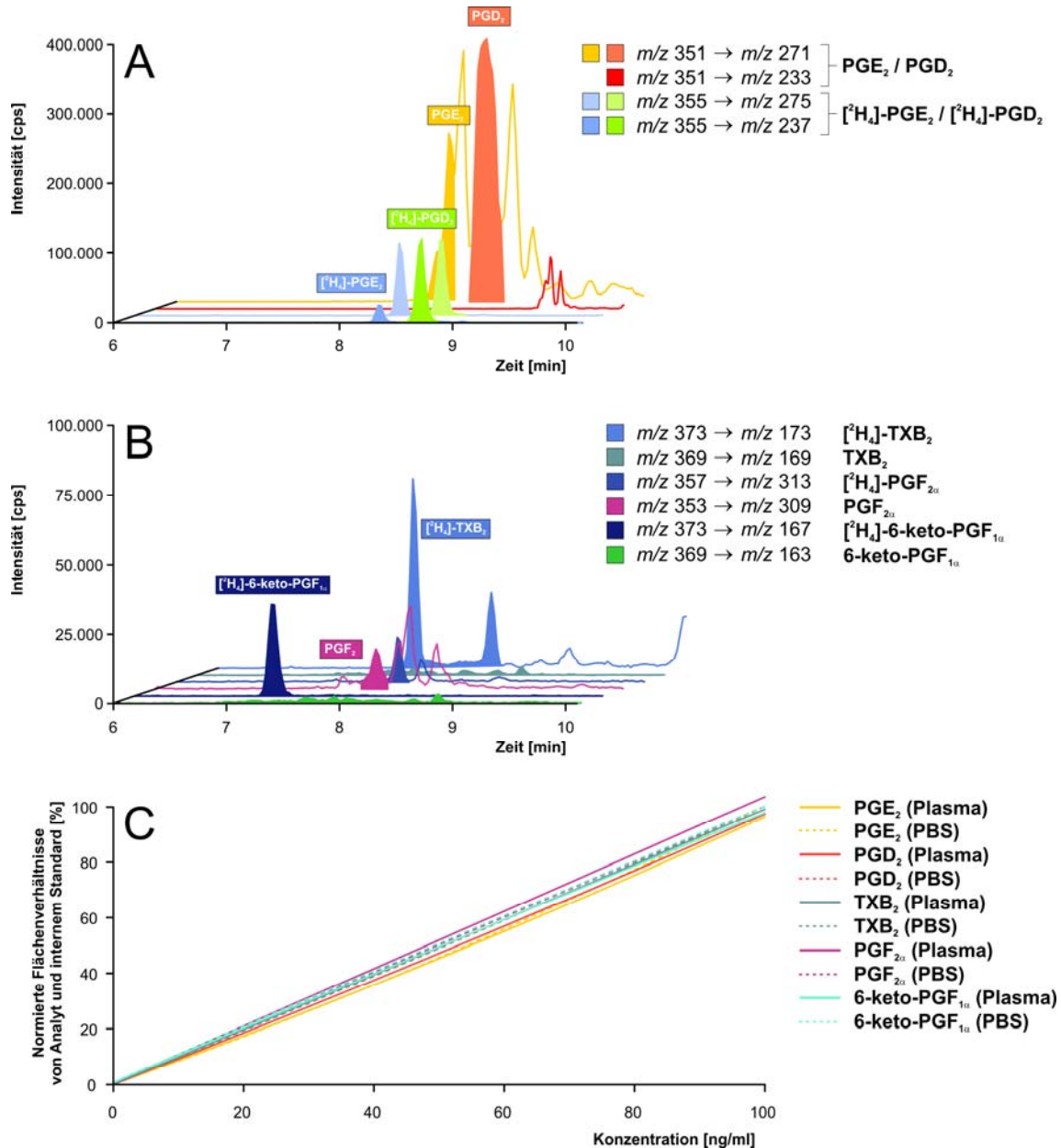


Abbildung 5-1: A. und B. Beispiel eines extrahierten Leerplasmas des Blutspendedienstes Hessen. Chromatogramm A und B zeigen die gleiche extrahierte Probe. Chromatogramm A repräsentiert PGE₂, PGD₂ und die zugehörigen internen Standards [²H₄]-PGE₂ und [²H₄]-PGD₂. Die Konzentration des PGE₂ und des PGD₂ entsprechen 8,7 ng/ml und 6,9 ng/ml. Chromatogramm B repräsentiert TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} und die zugehörigen internen Standards [²H₄]-TXA₂, [²H₄]-PGF_{2α} und [²H₄]-6-keto-PGF_{1α}. Die Konzentration des TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} entsprechen 0,17 ng/ml, 12,2 ng/ml und 0,3 ng/ml. **C.** Vergleich einer Standardreihe in frischem Humanplasma und einer Standardreihe in PBS. Dazu wurden die Peakflächenverhältnisse zwischen Analyt und dem zugehörigen internen Standard bestimmt und die Peakflächenverhältnisse des 100 ng/ml PBS-Kalibrationsstandards auf 100 % normiert.

5.2.4.1 Optimierung der Massenübergänge von PGF_{2α} und [²H₄]-PGF_{2α}

Für die Bestimmung der verschiedenen Prostaglandine wurde das jeweils sensitivste Fragment verwendet und auf das Wissen der vorherigen Kapitel zurückgegriffen. Im Gegensatz zum Kapitel 4, wo PGF_{2α} mit dem Übergang m/z 353 \rightarrow m/z 309 quantifiziert wurde, wurde jetzt der Übergang m/z 353 \rightarrow m/z 193 für PGF_{2α} verwendet, weil in diesem weniger Störpeaks auftraten (Abbildung 5-2 C). Zwischen dem Massenübergang m/z 353 \rightarrow m/z 193 und m/z 353 \rightarrow m/z 309 gibt es keine Sensitivitätsunterschiede. Für den internen Standard [²H₄]-PGF_{2α} wurden starke Interferenzen zur Retentionszeit von PGF_{2α} in dem Massenübergang m/z 357 \rightarrow m/z 313 beobachtet, die sich durch Änderung der Festphasenextraktion nicht entfernen ließen (Abbildung 5-2 A und C). Aus diesem Grund wurde für den internen Standard [²H₄]-PGF_{2α} der Massenübergang m/z 357 \rightarrow m/z 197 verwendet, der zwar auch eine Interferenz enthält, allerdings nicht zur Retentionszeit von PGF_{2α}. Da aufgrund der vielen Interferenzen m/z 357 \rightarrow m/z 313 nicht als Kontrollübergang von [²H₄]-PGF_{2α} in Frage kam, wurde der Übergang m/z 357 \rightarrow m/z 295 eingesetzt.

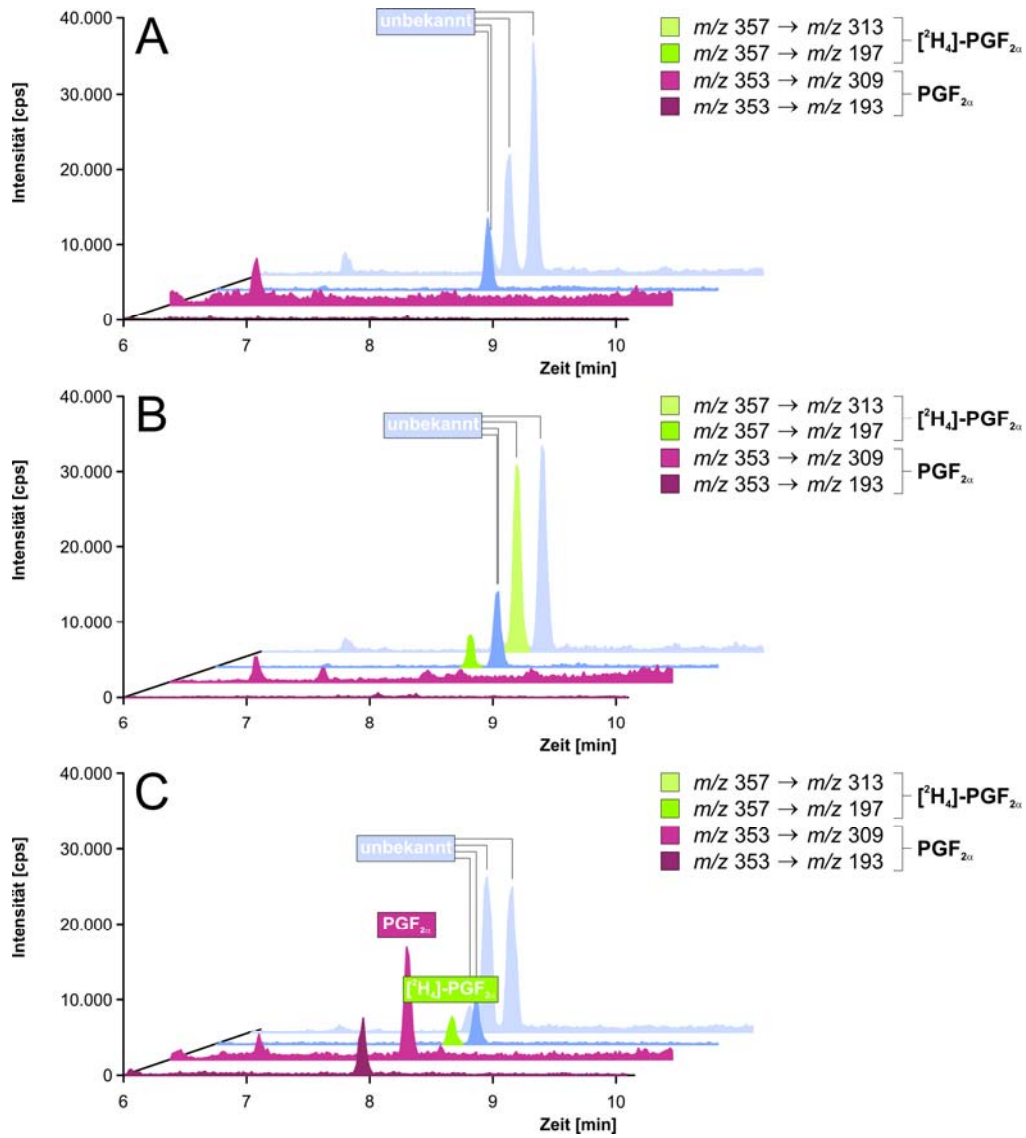


Abbildung 5-2. Interferenzen von Humanplasma mit PGF_{2α} und $[^2H_4]$ -PGF_{2α}. **A.** Repräsentatives Chromatogramm eines extrahierten Humanplasmas. **B.** Repräsentatives Chromatogramm eines extrahierten Humanplasmas, dem $[^2H_4]$ -PGF_{2α} zugesetzt wurde (Endkonzentration 4 ng/ml). **C.** Repräsentatives Chromatogramm eines extrahierten Humanplasmas, das mit PGF_{2α} (Endkonzentration 5 ng/ml) und $[^2H_4]$ -PGF_{2α} (Endkonzentration 4 ng/ml) dotiert wurden.

5.2.5 Ergebnisse der Optimierung

5.2.5.1 LC-MS/MS-Einstellungen Anlage II (API 4000)

Die Bestimmung von PGE₂ und PGD₂ wurde auf Anlage II (API 4000) mit einer Synergi Hydro-RP-Säule (150 mm · 2 mm I.D., 4 µm Partikelgröße und 80 Å Porengröße) und einer Aqua-C₁₈-Vorsäule (4 mm · 2 mm I.D., 10 µm Partikelgröße und 125 Å Porengröße) durchgeführt. Als mobile Phase A wurde Wasser/Ameisensäure (100:0,0025, v/v, pH 4,0) und Acetonitril/Ameisensäure (100:0,0025, v/v) als mobile Phase B eingesetzt. Um Kontaminationen der Lösungsmittel zu vermeiden, wurden die Fließmittel vor der Verwendung nicht mit Vakuum und Ultraschall entgast, sondern nur über den Entgaser der HPLC-Anlage. Die Fließgeschwindigkeit betrug während der gesamten Analyse 300 µl/min. Als Gradient wurde ein Stufengradient verwendet (Tabelle 5-2). Die Anfangsbedingungen betrugen 10 % mobile Phase B (t = 0 min), die für eine Minute gehalten (t = 1 min) wurden. Innerhalb der nächsten Minute wurde der Acetonitrilanteil auf 40 % linear erhöht (t = 2 min), für eine Minute beibehalten (t = 3 min) und während der nächsten Minute (t = 4 min) linear auf 50 % erhöht und erneut für zwei Minuten gehalten (t = 6 min). In den nächsten 2 Minuten wurde die mobile Phase B linear auf 90 % (t = 8 min) erhöht und diese Einstellung für 1 Minute beibehalten (t = 9 min). Anschließend wurden innerhalb von 1 Minute die Ausgangsbedingungen von 10 % mobile Phase wieder hergestellt (t = 10 min) und die Säule für 6 Minuten equilibriert (t = 16 min). Als Probensolvens wurde Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) verwendet. Die Retentionszeiten betrugen 7,4 min für 6-keto-PGF_{1α}, 8,0 min für TXB₂, 8,2 min für PGF_{2α}, 8,7 min für PGE₂ und 9,2 min für PGD₂. Für die HPLC und für das Probensolvens wurde Wasser und Acetonitril von der Firma Roth in LC-MS/MS-Qualität verwendet.

Das Tandem-Massenspektrometer (API 4000) wurde mit der Turbo-V-Spray-ESI-Quelle im negativen Ionenmodus verwendet. Die Temperatur der Quelle wurde mit Hilfe eines Gas-Druckes von 90 psi (GS2) auf 450°C eingestellt und an der Elektrospray-Nadel eine Spannung von -3300 V angelegt. Der Zerstäubergasdruck (GS1) betrug 30 psi und der Gasvorhangsdruck (*curtain gas*) 50 psi. Die Kollisionzelle enthielt $2,58 \cdot 10^{15}$ Moleküle N₂/cm². Sämtliche Quadrupole arbeiteten unter „unit“ Einstellung und im MRM-Modus. Für die Bestimmung der Analyten, dienten die in Tabelle 5-3 aufgeführten Massenübergänge.

Analyt	M ₁ m/z	M ₂ m/z	t [ms]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]	verwendeter IS
PGE ₂	{ 351,1 → 351,1	{ 271,2 → 189,1	50	-46	-5,5	-21,5	-7	[² H ₄]-PGE ₂
PGD ₂	{ 351,1 → 351,1	{ 271,2 → 233,0	50	-46	-5,5	-21,5	-7	[² H ₄]-PGD ₂
TXB ₂	{ 369,1 → 369,1	{ 168,9 → 194,9	50	-44	-4	-22	-10	[² H ₄]-TXB ₂
PGF _{2α}	{ 353,1 → 353,1	{ 193,0 → 309,1	50	-65	-3	-34	-11	[² H ₄]-PGF _{2α}
6-keto-PGF _{1α}	{ 369,1 → 369,1	{ 245,3 → 162,9	50	-69	-6,5	-38	-5	[² H ₄]-6-keto-PGF _{1α}
[² H ₄]-PGE ₂	355,1 → 355,1	275,1 → 275,1	50	-55	-5,5	-17	-5	
[² H ₄]-PGD ₂	355,1 → 355,1	237,0 → 237,0	50	-55	-5,5	-24	-7	
[² H ₄]-TXB ₂	{ 373,2 → 373,2	{ 173,0 → 199,0	50	-44	-4	-23,5	-10	
[² H ₄]-PGF _{2α}	{ 357,0 → 357,0	{ 197,1 → 295,4	50	-65	-3	-36	-5	
[² H ₄]-6-keto-PGF _{1α}	{ 373,2 → 373,2	{ 249,1 → 167,1	50	-69	-6,5	-34	-6	

Tabelle 5-3: Massenübergänge und zugehörige Spannungen der MRM-Methode. M₁ = m/z der Verbindung, M₂ = m/z des Fragments, DP = *declustering potential*, EP = *entrance potential*, CE = *collision energy*, CXP = *cell exit potential*, IS = Interner Standard.

5.2.5.2 Probenvorbereitung

PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ wurden in einer Konzentration von je 1.000.000 ng/ml als methanolische Lösungen bei -80°C gelagert. Aus diesen wurde eine methanolische Stammlösung mit 50.000 ng/ml PGE₂, PGD₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, TXB₂ hergestellt. Diese Stammlösung diente als Ausgangspunkt für die Herstellung des höchsten Standards (Nr. 10), von dem ausgehend verschiedene Verdünnungen nach dem Pipettierschema in Tabelle 5-4 hergestellt wurden.

Nr.	End-Konzentration [pg/ml]	effektive Konzentration [pg/ml]	Volumen der Stammlösung [μl]	Konzentration der Stammlösung [pg/ml]	Volumen Methanol [μl]
10	100	1.250	26	50.000	1014
9	30	375	312	100	728
8	10	125	340	30	680
7	3	37,5	318	10	742
6	1	12,5	351	3	702
5	0,3	3,75	351	1	819
4	0,1	1,25	468	0,3	936
3	0,06	0,75	702	0,1	468
2	0,03	0,375	467	0,06	467
1	0,01	0,125	234	0,03	468

Tabelle 5-4: Pipettierschema zur Herstellung der Standardreihe. Da 20 μl Standard zu 250 μl Humanplasma pipettiert werden sollen, muss die effektive Konzentration um den Faktor 12,5 höher sein als die angestrebte Endkonzentration im Humanplasma.

[²H₄]-PGE₂ wurde in einer Konzentration von 50.000 ng/ml, [²H₄]-PGD₂ in einer Konzentration von 100.000 ng/ml und [²H₄]-TXB₂, [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und [²H₄]-PGF_{2α} in einer Konzentration von 25.000 ng/ml als methanolische Lösungen bei -80°C aufbewahrt. Aus diesen wurde eine Lösung der internen Standards mit 25 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 25 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 25 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 10 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und 10 ng/ml [²H₄]-PGF_{2α} in Methanol hergestellt. Sämtliche Stamm- und Standardlösungen wurden in Glasfläschchen aufbewahrt und bei -80°C gelagert.

Kalibrations- und Qualitätsstandards wurden mit 250 μl PBS (oder 250 μl Plasma), 10 μl BHT (2 mg/ml in Methanol), 100 μl 0,15 M EDTA-Lösung, 20 μl Standard (0,125 – 1250 ng/ml in Methanol), 20 μl interner Standard (25 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 25 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 25 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 10 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und 10 ng/ml [²H₄]-PGF_{2α} in Methanol) und 600 μl 45 mM Phosphorsäure hergestellt, geschüttelt und 1 min bei 10.000 g zentrifugiert.

Reale Proben wurden ähnlich extrahiert. 250 μl mit LPS-inkubiertem Humanplasma wurden mit 10 μl BHT (2 mg/ml in Methanol), 100 μl 0,15 M EDTA-Lösung, 20 μl Methanol, 20 μl interner Standard (25 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 25 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 25 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 10 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und 10 ng/ml [²H₄]-PGF_{2α} in Methanol) und 600 μl 45 mM Phosphorsäure hergestellt, geschüttelt und 1 min bei 10.000 g zentrifugiert.

Für die Festphasenextraktion wurden 1 ml Nexus-SPE-Kartuschen von Varian verwendet. Diese wurden zuerst mit 2 x 1 ml Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (30:65:5, v/v) gewaschen und anschließend 20 Sekunden unter vollem Vakuum getrocknet. Die Säulen wurden anschließend mit 1 ml Methanol und 1 ml Wasser konditioniert und mit 1 ml Probe beladen. Anschließend wurden die Kartuschen mit 1 ml Wasser und 1 ml Methanol/Wasser (40:60, v/v) gewaschen und 7 Minuten unter vollem Vakuum ge-

trocknet. Die Analyten wurden anschließend mit 1 ml Hexan/Ethylacetat/Isopropanol (30:65:5, v/v) von den SPE-Säulen eluiert. Nach der Elution wurde das Lösungsmittel bei 45°C unter einem leichten Stickstoffstrom bis zur Trockne abgedampft und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen. Die Proben wurden anschließend 20 Sekunden lang geschüttelt, 2 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und in Glasfläschchen umgefüllt. Im Autosampler wurden die Proben während der Messung bei 2°C gelagert und 45 µl davon in das LC-MS/MS-System injiziert. Für die Festphasenextraktion wurde Wasser und Methanol von J.T.Baker in HPLC-Qualität verwendet.

Sofern die Proben nicht direkt nach der Extraktion gemessen werden konnten, wurden sie unter Stickstoffatmosphäre bei -80°C eingefroren.

5.2.5.3 Datenauswertung

Die Quantifizierung erfolgte anhand einer frisch extrahierten Standardreihe in PBS. Für die Berechnung der Regression wurde für alle Analyten das Verhältnis aus der Peakfläche des Analyten und der Peakfläche des zugehörigen internen Standards ermittelt und gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Zur Berechnung der Kalibrationsgerade wurde eine quadratische Regressionsanalyse mit einer Gewichtung von $1/\text{Konzentration}^2$ verwendet.

5.3 Methodenvalidierung

Da Prostaglandine immer im Humanplasma vorhanden sind, musste die Richtigkeit und Präzision der Methode mit PBS anstatt mit Humanplasma durchgeführt werden. Die Eignung von PBS als Ersatz für Humanplasma wurde bei der Bestimmung der Richtigkeit mit 6 frisch gewonnenen Humanplasmen überprüft. Die frisch gewonnenen Plasmen (von 3 männlichen und 3 weiblichen Probanden) wurden für die Bestimmung der Wiederfindung, der Matrixeffekte und der Stabilität verwendet. In den 6 Plasmen betrugen die Konzentrationen von PGE₂ $0,008 \pm 0,006$ ng/ml, von PGD₂ $0,007 \pm 0,003$ ng/ml, von TXB₂ $0,058 \pm 0,026$ ng/ml und von 6-keto-PGF_{1 α} $0,125 \pm 0,110$ ng/ml. PGF_{2 α} konnte in keinem der 6 Plasmen detektiert werden. Diese 6 Plasmen wurden aliquotiert und bei -80 Grad eingefroren.

5.3.1 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde mit PBS bestimmt. Jede Standardreihe wurde nach 5.2.5 mit PBS hergestellt und anschließend extrahiert. Für alle Konzentrationen wurden die Verhältnisse der Peakflächen der Analyten und der Peakfläche des zugehörigen internen Standards bestimmt, daraus eine Regressionskurve errechnet und für jede Konzentration der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) berechnet. Die Richtigkeit der Methode in PBS betrug für PGE₂ $99,6 \% \pm 6,0 \%$, für PGD₂ $99,8 \% \pm 4,5 \%$ und für TXB₂ $100,5 \% \pm 7,8 \%$ im Bereich zwischen 0,01 ng/ml und 100 ng/ml. Für 6-keto-PGF_{1 α} konnte eine Richtigkeit von $101,3 \% \pm 5,9 \%$ für den Konzentrationsbereich von 0,1 ng/ml bis 100 ng/ml und für PGF_{2 α} von $100,5 \% \pm 6,5 \%$ für den Konzentrationsbereich von 0,3 ng/ml bis 100 ng/ml ermittelt werden.

Um die Eignung der Methode für Humanplasma zu überprüfen, wurden gleichzeitig 6 Standardreihen in Humanplasmen (von 3 männlichen und 3 weiblichen Probanden) angesetzt und extrahiert. Die Prostaglandin-Basalkonzentrationen dieser 6 Plasmen wurden mit den 6 vorherigen Standardreihen in PBS bestimmt. In den 6 frisch gewonnenen Plasmen betrugen die Konzentrationen von PGE₂ $0,008 \pm 0,006$ ng/ml, von PGD₂ $0,007 \pm 0,003$ ng/ml, von TXB₂ $0,058 \pm 0,026$ ng/ml und von 6-keto-PGF_{1 α} $0,125 \pm 0,110$ ng/ml. PGF_{2 α} konnte in keinem der 6 Plasmen detektiert werden. Für eine Bestimmung der Richtigkeit, dürfen laut FDA zwar Störpeaks vorhanden sein, die aber nur 1/5 der Peakhöhe des untersten Kalibrationsstandards betragen. Um diese Vorgabe für die Richtigkeit in Humanplasma umzusetzen, darf der niedrigste Kalibrationsstandard z.B. für PGE₂ nicht kleiner als ca. 0,04 ng/ml betragen. Um den Fehler dieser Methode weiter zu minimieren, wurden die Quantifizierungsgrenzen bei der Verwendung von Humanplasma zur Kalibration durch Multiplikation der Prostaglandin-Basalwerte mit 10 festgelegt. In Humanplasma wurde deshalb eine Quantifizierungsgrenze für PGE₂ und PGD₂ von 0,1 ng/ml, für PGF_{2 α} von 0,3 ng/ml und für TXB₂ und 6-keto-PGF_{1 α} von 1 ng/ml festgelegt.

Für alle Konzentrationen der 6 Standardreihen in Humanplasma wurden die Verhältnisse der Peakflächen der Analyten und der Peakfläche des zugehörigen internen Standards bestimmt und die Konzent-

rationen mit den Regressionskurven aus der Richtigkeit in PBS errechnet. Für jede Konzentration wurde der Mittelwert (μ), die Standardabweichung (SD) und die relative Standardabweichung (RSD) berechnet. Die Richtigkeit der Methode in Humanplasma betrug für PGE₂ 97,9 % \pm 4,9 % und für PGD₂ 100,6 % \pm 6,5 % im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 ng/ml und 100 ng/ml. Für TXB₂ und für 6-keto-PGF_{1 α} ergab sich eine Richtigkeit von 100,0 % \pm 5,1 % und 100,4 % \pm 5,1 % im Bereich zwischen 1 ng/ml und 100 ng/ml. Für PGF_{2 α} wurde eine Richtigkeit von 99,6 % \pm 7,5 % für den Konzentrationsbereich von 0,3 ng/ml bis 100 ng/ml ermittelt.

Die Richtigkeiten in Humanplasma (ab der jeweiligen Quantifizierungsgrenze) waren mit den Richtigkeiten in PBS vergleichbar (Tabelle 5-5). Der beste Wert für die Richtigkeit wurde mit einer gewichteten quadratischen Regression und einem Wichtungsfaktor von $1/\text{Konzentration}^2$ erhalten. Die genauen Werte für jede Konzentration sind in Tabelle 5-5 wiedergegeben.

Analyt	Konzentration (ng/ml)	Richtigkeit					
		PBS			Plasma		
		Richtigkeit \pm SD (n = 6) (ng/ml) (%)		RSD (%)	Richtigkeit \pm SD (n = 6) (ng/ml) (%)		RSD (%)
PGE ₂	0,01	0,0099 \pm 0,0007	98,7 \pm 7,2	7,3	-	-	-
	0,03	0,031 \pm 0,003	102,9 \pm 10,7	10,4	-	-	-
	0,06	0,060 \pm 0,004	99,6 \pm 6,8	6,9	-	-	-
	0,1	0,10 \pm 0,005	102,2 \pm 4,9	4,8	0,10 \pm 0,009	104,8 \pm 9,1	8,7
	0,3	0,32 \pm 0,02	106,2 \pm 8,0	7,6	0,30 \pm 0,02	100,0 \pm 7,8	7,8
	1	0,96 \pm 0,02	95,9 \pm 2,4	2,5	0,91 \pm 0,04	90,8 \pm 4,2	4,6
	3	3,01 \pm 0,12	100,4 \pm 4,0	4,0	2,86 \pm 0,18	95,4 \pm 5,8	6,1
	10	9,4 \pm 0,3	94,3 \pm 3,1	3,3	9,4 \pm 0,2	93,9 \pm 2,2	2,3
	30	27,7 \pm 1,8	92,2 \pm 6,0	6,5	29,2 \pm 1,0	97,4 \pm 3,2	3,3
	100	103,6 \pm 6,8	103,6 \pm 6,8	6,6	102,8 \pm 2,3	102,8 \pm 2,3	2,3
	μ		99,6 \pm 6,0	6,0		97,9 \pm 4,9	5,0
PGD ₂	0,01	0,0095 \pm 0,0014	94,6 \pm 14,0	14,8	-	-	-
	0,03	0,031 \pm 0,003	104,1 \pm 8,4	8,1	-	-	-
	0,06	0,060 \pm 0,002	100,7 \pm 3,4	3,4	-	-	-
	0,1	0,10 \pm 0,003	96,8 \pm 3,2	3,3	0,10 \pm 0,009	96,1 \pm 9,2	9,6
	0,3	0,30 \pm 0,01	99,7 \pm 4,2	4,2	0,32 \pm 0,02	105,7 \pm 5,1	4,8
	1	1,02 \pm 0,04	102,2 \pm 3,9	3,8	1,02 \pm 0,09	101,7 \pm 8,7	8,5
	3	2,95 \pm 0,09	98,2 \pm 2,9	3,0	3,17 \pm 0,19	105,7 \pm 6,3	5,9
	10	10,2 \pm 0,1	101,6 \pm 1,4	1,3	9,5 \pm 0,4	95,2 \pm 4,1	4,3
	30	30,4 \pm 0,6	101,4 \pm 1,9	1,9	27,1 \pm 1,7	90,4 \pm 5,6	6,2
	100	99,1 \pm 2,0	99,1 \pm 2,0	2,0	109,5 \pm 7,0	109,5 \pm 7,0	6,4
	μ		99,8 \pm 4,5	4,6		100,6 \pm 6,6	6,5
TXB ₂	0,01	0,0104 \pm 0,0013	104,1 \pm 13,1	12,6	-	-	-
	0,03	0,029 \pm 0,004	95,2 \pm 14,0	14,7	-	-	-
	0,06	0,057 \pm 0,008	95,6 \pm 13,1	13,7	-	-	-
	0,1	0,09 \pm 0,009	93,3 \pm 8,8	9,4	-	-	-
	0,3	0,30 \pm 0,01	100,7 \pm 3,9	3,8	-	-	-
	1	1,03 \pm 0,07	102,6 \pm 7,1	6,9	1,02 \pm 0,06	101,6 \pm 5,8	5,7
	3	3,19 \pm 0,12	106,3 \pm 4,0	3,7	2,97 \pm 0,27	99,1 \pm 9,2	9,2
	10	10,4 \pm 0,6	104,5 \pm 6,2	5,9	9,9 \pm 0,1	99,1 \pm 1,2	1,2
	30	31,6 \pm 1,7	105,2 \pm 5,6	5,4	30,1 \pm 1,8	100,3 \pm 5,9	5,8
	100	97,8 \pm 2,1	97,8 \pm 2,1	2,2	100,0 \pm 3,3	100,0 \pm 3,3	3,3
	μ		100,5 \pm 7,8	7,8		100,0 \pm 5,1	5,1
6-keto-PGF _{1α}	0,1	0,09 \pm 0,012	93,7 \pm 12,3	13,1	-	-	-
	0,3	0,32 \pm 0,02	105,4 \pm 7,2	6,8	-	-	-
	1	1,01 \pm 0,03	100,7 \pm 3,2	3,2	1,05 \pm 0,04	104,7 \pm 3,8	3,7
	3	3,06 \pm 0,11	101,9 \pm 3,7	3,7	2,82 \pm 0,21	93,9 \pm 7,0	7,4
	10	10,3 \pm 0,6	103,5 \pm 5,7	5,5	10,5 \pm 0,9	105,4 \pm 8,5	8,1
	30	30,2 \pm 1,0	100,7 \pm 3,4	3,4	29,4 \pm 1,5	97,9 \pm 4,8	4,9
	100	103,4 \pm 5,6	103,4 \pm 5,6	5,4	100,2 \pm 1,2	100,2 \pm 1,2	1,2
	μ		101,3 \pm 5,9	5,9		100,4 \pm 5,1	5,1
PGF _{2α}	0,3	0,30 \pm 0,04	99,8 \pm 11,9	11,9	0,29 \pm 0,03	95,6 \pm 9,0	9,5
	1	1,01 \pm 0,07	100,5 \pm 6,8	6,8	1,05 \pm 0,05	104,6 \pm 4,7	4,5
	3	3,00 \pm 0,18	100,1 \pm 5,9	5,9	2,97 \pm 0,18	99,0 \pm 6,1	6,1
	10	10,3 \pm 0,6	102,9 \pm 6,4	6,2	9,9 \pm 0,9	98,7 \pm 8,9	9,0
	30	29,8 \pm 1,1	99,2 \pm 3,8	3,9	29,2 \pm 2,5	97,4 \pm 8,2	8,4
	100	100,5 \pm 4,0	100,5 \pm 4,0	4,0	102,1 \pm 7,8	102,1 \pm 7,8	7,7
	μ		100,5 \pm 6,5	6,4		99,6 \pm 7,5	7,5

Tabelle 5-5: Zusammenfassung der Richtigkeit von PGE₂, PGD₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1 α} und PGF_{2 α} von extrahierten Kalibrationsstandards in PBS und Plasma. Die Richtigkeit wurde mit je 6 Standardreihen in PBS und Humanplasma bestimmt, die nach 5.2.5 mit 1 ml absolut-Nexus-SPE-Kartuschen extrahiert wurden. Blind- und Doppelblindproben aus PBS enthielten keine Prostaglandine. Blind- und Doppelblindproben aus frischem Plas-

ma (von 3 männlichen und 3 weiblichen Probanden) enthielten zwar kein PGF_{2α}, allerdings geringe Mengen an PGE₂ ($0,008 \pm 0,006$ ng/ml), PGD₂ ($0,007 \pm 0,003$ ng/ml), TXB₂ ($0,058 \pm 0,026$ ng/ml) und 6-keto-PGF_{1α} ($0,125 \pm 0,110$ ng/ml). In allen Versuchen betrug die Endkonzentration der internen Standards [²H₄]-PGE₂ 10 ng/ml, [²H₄]-PGD₂ 10 ng/ml, [²H₄]-TXB₂ 10 ng/ml, [²H₄]-PGF_{2α} 4 ng/ml und [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} 4 ng/ml. Abkürzungen: μ = Mittelwert, SD = Standardabweichung, RSD = relative Standardabweichung.

5.3.2 Selektivität und Spezifität

Die Bestimmung der Selektivität wurde gleichzeitig mit der Ermittlung der Richtigkeit durchgeführt. Sämtliche sechs Doppelblind- und Blindproben in PBS zeigten keine Störpeaks bei den zu erwartenden Retentionszeiten der Analyten und den internen Standards.

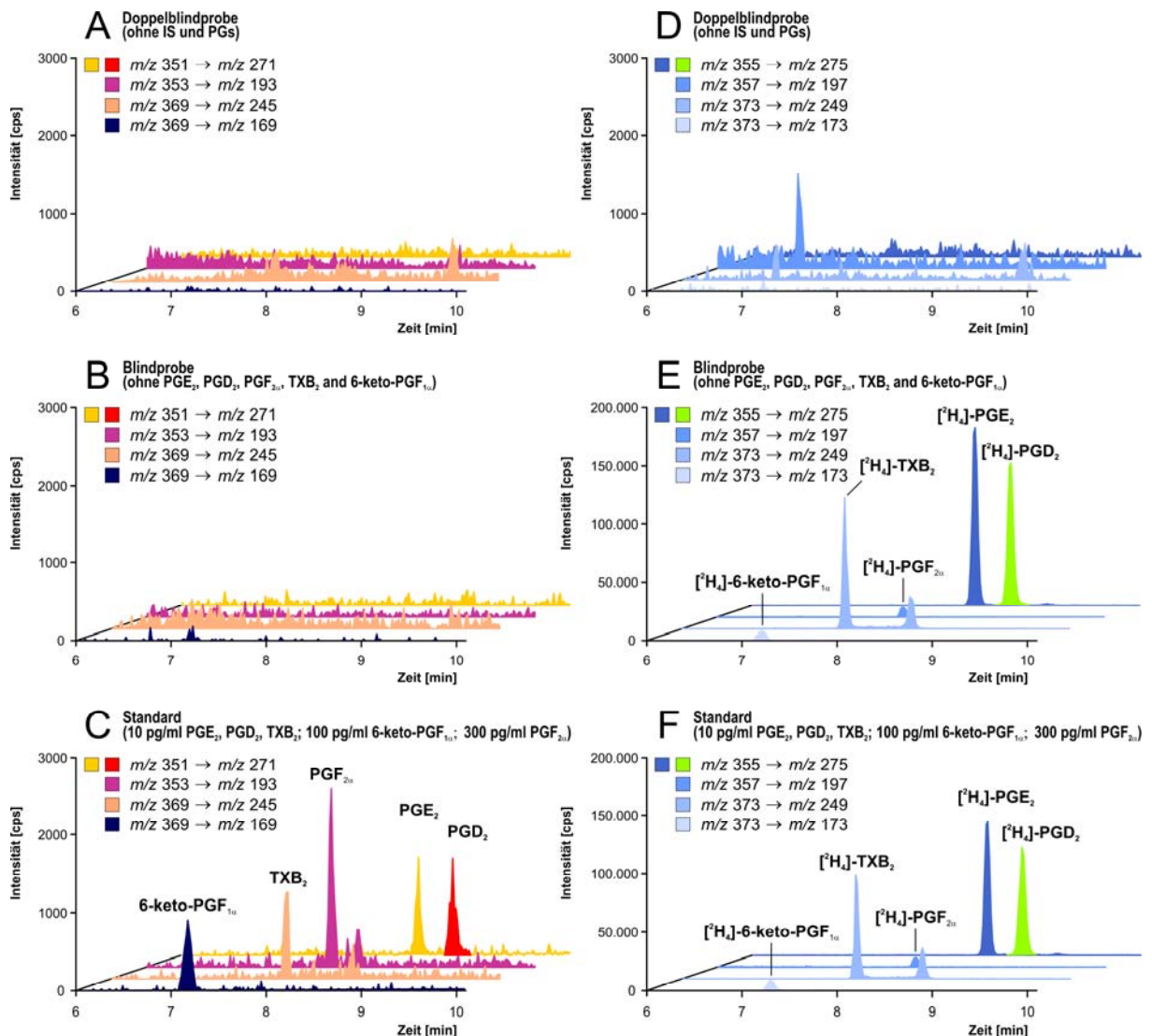


Abbildung 5-6: Selektivität der LC-MS/MS-Methode für extrahierte PBS-Kalibrationsstandards. Chromatogramm A und D zeigen eine extrahierte Doppelblindprobe, Chromatogramm B und E eine Blindprobe und Chromatogramm C und F repräsentieren die Quantifizierungsgrenze der Methode. Die Chromatogramme C und F wurden aus 3 verschiedenen Chromatogrammen kombiniert: PGE₂, PGD₂ und TXB₂ aus einem 0,01 ng/ml Standard, 6-keto-PGF_{1α} aus einem 0,1 ng/ml Standard und PGF_{2α} aus einem 0,3 ng/ml Standard.

5.3.3 Präzision

Die Methodenpräzision wurde an vier verschiedenen Tagen mit jeweils 4 Konzentrationen (0,01, 0,1, 3 und 100 ng/ml), Blind- und Doppelblindproben in PBS durchgeführt. Blindproben wurden mit internem Standard und PBS hergestellt und Doppelblindproben bestanden nur aus PBS. Jede Konzentration, Blind- und Doppelblindprobe wurde 8 Mal nach 5.2.5 mit PBS angesetzt und extrahiert. Nach dem Abdampfen der organischen Phase wurde der Rückstand in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen und nach Zentrifugation jeweils zu einer einzigen Probe vereinigt (400 µl pro Konzentration, Blind- oder Doppelblindprobe).

Analyt	Konzentration (ng/ml)	Intraday		Interday	
		$\mu \pm SD$ (% , n = 6)	RSD (%)	$\mu \pm SD$ (% , n = 6)	RSD (%)
PGE ₂	0,01	99,7 ± 10,8	10,8	106,5 ± 13,5	12,7
	0,1	100,7 ± 6,3	6,3	96,6 ± 6,5	6,8
	3	99,5 ± 3,7	3,7	103,5 ± 3,6	3,5
	100	100,0 ± 4,0	4,0	99,6 ± 2,9	2,9
	μ	100,0 ± 6,2	6,2	101,5 ± 6,6	6,5
PGD ₂	0,01	100,2 ± 8,0	8,0	103,3 ± 12,8	12,4
	0,1	99,4 ± 7,1	7,1	98,8 ± 7,2	7,3
	3	100,4 ± 2,6	2,6	102,9 ± 2,9	2,8
	100	100,1 ± 4,0	4,0	99,7 ± 3,0	3,0
	μ	100,0 ± 5,4	5,4	101,2 ± 6,5	6,4
TXB ₂	0,01	99,8 ± 13,9	13,9	100,1 ± 14,5	14,5
	0,1	98,2 ± 6,9	7,0	102,1 ± 8,2	8,0
	3	102,3 ± 2,9	2,8	99,4 ± 2,5	2,5
	100	99,7 ± 2,6	2,6	103,2 ± 4,8	4,7
	μ	100,0 ± 6,6	6,6	101,2 ± 7,5	7,4
PGF _{2α}	0,01	< LLOQ	-	< LLOQ	-
	0,1	100,0 ± 11,0	13,8	99,6 ± 11,5	11,5
	3	99,9 ± 3,4	3,4	102,8 ± 3,8	3,7
	100	100,1 ± 4,4	4,4	99,5 ± 5,4	5,4
	μ	100,0 ± 6,3	7,2	100,6 ± 6,9	6,9
6-keto-PGF _{1α}	0,01	< LLOQ	-	< LLOQ	-
	0,1	99,3 ± 13,2	13,3	92,3 ± 11,2	12,1
	3	97,5 ± 2,7	2,8	103,7 ± 4,0	3,9
	100	100,5 ± 6,0	6,0	99,3 ± 3,9	3,9
	μ	99,1 ± 7,3	7,3	98,4 ± 6,4	6,6

Tabelle 5-6: Ergebnisse von Intraday- und Interday-Präzision für PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α}. In allen Versuchen betrug die Endkonzentration der internen Standards [²H₄]-PGE₂ 10 ng/ml, [²H₄]-PGD₂ 10 ng/ml, [²H₄]-TXB₂ 10 ng/ml, [²H₄]-PGF_{2α} 4 ng/ml und [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} 4 ng/ml. Abkürzungen: μ = Mittelwert, *SD* = Standardabweichung, *RSD* = relative Standardabweichung.

Jede vereinigte Probe wurde 6 Mal hintereinander in das LC-MS/MS-System injiziert und die Konzentration von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} bestimmt. Zur Berechnung der Standardreihe wurden die Peakflächenverhältnisse der Analyten zum jeweiligen internen Standard jeder injizierten Probe verwendet. Anschließend wurde für jeden Tag der Mittelwert (μ), die Standardabwei-

chung (*SD*) und die relative Standardabweichung (*RSD*) der Peakflächenverhältnisse für jede Konzentration, Blind- und Doppelblindprobe errechnet (Tabelle 5-6).

Als Quantifizierungsgrenze der Methode wurde die Konzentration des Analyten festgelegt, wo die Standardabweichung der Richtigkeit und die relative Standardabweichung der Methodenpräzision nicht mehr als 15 % betragen (85 % bis 115 %). Für PGE₂, PGD₂ und TXB₂ ergab sich eine Quantifizierungsgrenze von 0,01 ng/ml, für 6-keto-PGF_{1α} von 0,1 ng/ml. Obwohl PGF_{2α} auch noch bei 0,1 ng/ml eine ausreichende Präzision zeigt, wurde aufgrund der Daten der Richtigkeit eine Quantifizierungsgrenze von 0,3 ng/ml festgesetzt.

5.3.4 Wiederfindung

Die Wiederfindung aller Analyten und internen Standards wurde mit vier verschiedenen Konzentrationen (0,1, 1, 10 und 100 ng/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde sechs Mal nach 4.2.5 mit Humanplasmen angesetzt und extrahiert (Ansatz A). Zusätzlich wurden pro Konzentration 6 Doppelblindproben angesetzt und diese nach dem Abdampfen der organischen Phase in je 50 µl Lösungsmittel-Standards in Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen, die die gleiche Stoffmenge an Analyten und internen Standards enthielten wie die extrahierten Standards (Ansatz B).

Zur Bestimmung der relativen Wiederfindung wurde die Peakfläche der extrahierten Proben (Ansatz A) mit der Peakfläche der dotierten Doppelblindproben (Ansatz B) verglichen, die nach dem Abdampfen mit Standard versetzt wurden. Die mittlere relative Wiederfindung von PGE₂ betrug 87,1 % ± 12,2 %, von [²H₄]-PGE₂ 88,7 % ± 12,0 %, von PGD₂ 86,2 % ± 10,7 %, von [²H₄]-PGD₂ 86,4 % ± 10,2 %, von TXB₂ 77,1 % ± 12,2 %, von [²H₄]-TXB₂ 73,2 % ± 7,5 %, von PGF_{2α} 64,6 % ± 9,1 %, von [²H₄]-PGF_{2α} 65,5 % ± 5,0 %, von 6-keto-PGF_{1α} 65,7 % ± 5,9 % und von [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} 63,0 % ± 4,7 % (Tabelle 5-7).

Dagegen wurde die absolute Wiederfindung durch den Vergleich der Peakflächen der extrahierten Proben (Ansatz A) mit nicht extrahierten Lösungsmittelstandards ermittelt. Die mittlere absolute Wiederfindung von PGE₂ betrug 73,1 % ± 15,5 %, von [²H₄]-PGE₂ 76,1 % ± 18,1 %, von PGD₂ 177,7 % ± 21,0 %, von [²H₄]-PGD₂ 177,4 % ± 20,4 %, von TXB₂ 77,4 % ± 10,5 %, von [²H₄]-TXB₂ 76,2 % ± 9,5 %, von PGF_{2α} 63,9 % ± 9,1 %, von [²H₄]-PGF_{2α} 62,7 % ± 9,5 %, von 6-keto-PGF_{1α} 72,3 % ± 8,6 % und von [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} 70,9 % ± 8,9 % (Tabelle 5-7).

Die relative und absolute Wiederfindung von TXB₂ und 6-keto-PGF_{1α} bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml sind mit einem größeren Fehler behaftet, da die TXB₂- und 6-keto-PGF_{1α}-Basalkonzentration der verwendeten Plasmen bereits 0,058 ± 0,026 ng/ml und 0,125 ± 0,110 ng/ml betragen.

Analyt	Konzentration (ng/ml)	Relative Wiederfindung	Absolute Wiederfindung
		$\mu \pm SD$ (%, n = 6)	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE ₂	0,1	87,1 ± 11,7	81,5 ± 24,8
	1	75,5 ± 10,1	52,8 ± 7,9
	10	80,9 ± 18,0	62,7 ± 19,2
	100	104,8 ± 9,0	95,6 ± 10,2
	μ	87,1 ± 12,2	73,1 ± 15,5
PGD ₂	0,1	87,0 ± 12,0	192,7 ± 38,3
	1	76,8 ± 11,0	162,8 ± 15,2
	10	93,7 ± 13,2	175,3 ± 21,1
	100	87,1 ± 6,5	180,1 ± 9,3
	μ	86,2 ± 10,7	177,7 ± 21,0
TXB ₂	0,1	83,9 ± 23,3	87,2 ± 19,6
	1	64,7 ± 9,3	68,6 ± 8,3
	10	71,4 ± 9,7	67,1 ± 8,2
	100	88,5 ± 6,4	86,5 ± 5,7
	μ	77,1 ± 12,2	77,4 ± 10,5
PGF _{2α}	0,1	68,6 ± 19,4	66,1 ± 18,1
	1	54,1 ± 7,4	54,5 ± 11,5
	10	60,8 ± 4,5	59,8 ± 6,9
	100	75,0 ± 5,2	75,2 ± 3,0
	μ	64,6 ± 9,1	63,9 ± 9,9
6-keto-PGF _{1α}	0,1	70,1 ± 6,1	77,3 ± 13,6
	1	59,7 ± 4,5	66,0 ± 8,4
	10	60,2 ± 6,5	66,6 ± 7,3
	100	72,7 ± 6,4	79,5 ± 4,9
	μ	65,7 ± 5,9	72,3 ± 8,6
[² H ₄]-PGE ₂	0,1	85,6 ± 6,7	79,8 ± 29,7
	1	76,4 ± 9,9	56,2 ± 10,5
	10	80,7 ± 19,4	64,4 ± 19,7
	100	112,0 ± 12,1	104,2 ± 12,3
	μ	88,7 ± 12,0	76,1 ± 18,1
[² H ₄]-PGD ₂	0,1	89,7 ± 5,8	188,3 ± 31,7
	1	75,6 ± 11,3	163,9 ± 17,3
	10	94,8 ± 16,8	177,1 ± 22,7
	100	85,7 ± 6,7	180,2 ± 10,1
	μ	86,4 ± 10,2	177,4 ± 20,4
[² H ₄]-TXB ₂	0,1	67,2 ± 5,3	71,1 ± 14,3
	1	65,5 ± 5,9	72,2 ± 8,4
	10	70,7 ± 10,1	76,1 ± 7,8
	100	89,6 ± 8,8	85,5 ± 7,5
	μ	73,2 ± 7,5	76,2 ± 9,5
[² H ₄]-PGF _{2α}	0,1	52,6 ± 4,9	63,0 ± 13,7
	1	50,4 ± 4,3	56,2 ± 12,4
	10	57,9 ± 5,7	58,5 ± 8,9
	100	71,1 ± 5,1	72,9 ± 2,9
	μ	58,0 ± 5,0	62,7 ± 9,5
[² H ₄]-6-keto-PGF _{1α}	0,1	62,0 ± 3,9	72,3 ± 13,7
	1	60,0 ± 3,4	66,8 ± 9,3
	10	58,5 ± 4,7	66,1 ± 6,1
	100	71,3 ± 6,6	78,3 ± 6,4
	μ	63,0 ± 4,7	70,9 ± 8,9

Tabelle 5-7: Ergebnisse von relativer und absoluter Wiederfindung für die Extraktion von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2 α} , 6-keto-PGF_{1 α} , [²H₄]-PGE₂, [²H₄]-PGD₂, [²H₄]-TXB₂, [²H₄]-PGF_{2 α} und [²H₄]-6-keto-PGF_{1 α} aus Humanplasma. Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) ± Standardabweichung (SD).

5.3.5 Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte

Um Matrix- und Signal-beeinflussende Effekte zu bestimmen, wurden 36 Doppelblindproben nach 5.2.5 aus 6 frischen Humanplasmen hergestellt und extrahiert. Nach dem Abdampfen wurden die Doppelblindproben in je 50 µl Lösungsmittel-Standard in Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen. Der verwendete Lösungsmittelstandard enthielt 15 ng/ml PGE₂, 15 ng/ml PGD₂, 15 ng/ml TXB₂, 15 ng/ml PGF_{2α}, 15 ng/ml 6-keto-PGF_{1α}, 10 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 10 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 10 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 4 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und 4 ng/ml [²H₄]-PGF_{2α} in Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) und entsprach somit einem extrahierten 3 ng/ml Kalibrationsstandard. Die Peakflächen der 36 dotierten Doppelblindproben wurden mit den Peakflächen von 36 matrixfreien Lösungsmittel-Standards der gleichen Stoffmenge verglichen.

Mit Ausnahme von PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ konnte für alle Prostaglandine eine Signalsuppression zwischen 15 und 25 % festgestellt werden (Tabelle 5-8). PGD₂ und [²H₄]-PGD₂ zeigten genauso wie unter Kapitel 4 eine Signalverstärkung. Da sich sowohl auf die Analyten als auch auf die zugehörigen internen Standards die gleichen Signal-beeinflussenden Effekte der Matrix auswirken, gibt es keine Schwierigkeiten bei der Datenauswertung.

Matrixeffekte	
Analyt	$\mu \pm SD$ (%, n = 36)
PGE₂	77,7 ± 5,3
PGD₂	189,2 ± 19,5
TXB₂	74,6 ± 5,5
6-keto-PGF_{1α}	76,6 ± 8,6
PGF_{2α}	84,6 ± 10,2
[²H₄]-PGE₂	76,7 ± 4,9
[²H₄]-PGD₂	172,9 ± 20,9
[²H₄]-TXB₂	74,2 ± 6,5
[²H₄]-6-keto-PGF_{1α}	77,6 ± 9,1
[²H₄]-PGF_{2α}	86,8 ± 11,0

Tabelle 5-8: Ergebnisse der Bestimmung von Matrixeffekten für die Extraktion von PGE₂, PGD₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α}, PGF_{2α}, [²H₄]-PGE₂, [²H₄]-PGD₂, [²H₄]-TXB₂, [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und [²H₄]-PGF_{2α} aus Humanplasma. Die Konzentration betrugen 15 ng/ml PGE₂, 15 ng/ml PGD₂, 15 ng/ml TXB₂, 15 ng/ml PGF_{2α}, 15 ng/ml 6-keto-PGF_{1α}, 10 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 10 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 10 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 4 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und 4 ng/ml [²H₄]-PGF_{2α} in Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0). Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) ± Standardabweichung (SD).

5.3.6 Stabilität

5.3.6.1 Einfrier-Auftau-Stabilität

Die Einfrier-Auftau-Stabilität von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} wurde mit einer niedrigen, mittleren und hohen Konzentration (0,1, 3 und 100 ng/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde 6 Mal in 6 verschiedenen Humanplasmen angesetzt, mit 10 µl BHT (2 mg/ml in Methanol) und 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung versetzt und bei -80°C mit eingefroren. Nach 24 Stunden wurden die Proben für 45 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend wieder bei -80°C eingefroren. Der Zyklus wurde zwei weitere Male wiederholt und die Proben nach dem dritten Auftauen nach 5.2.5 extrahiert und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen und der Gehalt auf Anlage II gegen eine frisch extrahierte Standardreihe in Humanplasma bestimmt. Alle fünf Prostaglandine waren unter den Bedingungen stabil (Tabelle 5-9).

5.3.6.2 Langzeitstabilität

Die Langzeitstabilität unter Lagerungsbedingungen von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} wurde mit einer niedrigen, mittleren und hohen Konzentration (0,1, 3 und 100 ng/ml) ermittelt. Jede Konzentration wurde 6 Mal in 6 verschiedenen Humanplasmen angesetzt, mit 10 µl BHT (2 mg/ml in Methanol) und 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung versetzt und bei -80°C eingefroren. Nach 4 Wochen wurden die Proben nach 5.2.5 extrahiert und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen und der Gehalt auf Anlage II gegen eine frisch extrahierte Standardreihe in Humanplasma bestimmt. Alle fünf Prostaglandine waren unter den Bedingungen stabil (Tabelle 5-9).

5.3.6.3 Kurzzeit-Stabilität

Zur Bestimmung der Kurzzeit-Stabilität von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} wurden drei verschiedene Konzentrationen (0,1, 3 und 100 ng/ml) 6 Mal in verschiedenen Humanplasmen angesetzt, mit 10 µl BHT (2 mg/ml in Methanol) und 100 µl 0,15 M EDTA-Lösung versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur gelagert. Anschließend wurden die Proben nach 5.2.5 extrahiert und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen und gegen eine frisch extrahierte Standardreihe in Humanplasma gemessen. Während der Aufarbeitung wurden Verluste von 17,3 % für PGE₂ und 22,7 % für PGD₂ beobachtet werden (Tabelle 5-9). TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} waren unter den Bedingungen stabil.

5.3.6.4 Probenstabilität im Autosampler

Zur Bestimmung der Stabilität im Autosampler von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} wurden drei verschiedene Konzentrationen (0,1, 3 und 100 ng/ml) je 6 Mal nach 4.2.5 mit verschiedenen Humanplasmen angesetzt, extrahiert, und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben im Autosampler bei 2°C

± 1°C aufbewahrt und nach 24 Stunden gegen eine frisch extrahierte Standardreihe in Humanplasma gemessen.

Während der Lagerung unter den jeweiligen Messbedingungen konnte keine Beeinflussung der Stabilität festgestellt werden (Tabelle 5-9).

		Kurzzeit-stabilität	Stabilität im Autosampler	Einfrier-Auftau-Stabilität	Langzeit-Stabilität
Analyt	Konzentration (ng/ml)	$\mu \pm SD$ (% , n = 6)	$\mu \pm SD$ (% , n = 6)	$\mu \pm SD$ (% , n = 6)	$\mu \pm SD$ (% , n = 6)
PGE₂	0,1	106,2 ± 6,2	91,1 ± 3,7	97,3 ± 17,3	93,7 ± 11,5
	3	103,2 ± 2,5	102,2 ± 4,0	102,8 ± 1,8	94,3 ± 5,6
	100	101,5 ± 1,8	98,4 ± 3,4	98,2 ± 2,9	101,7 ± 1,7
	μ	103,6 ± 3,5	97,2 ± 3,7	99,4 ± 7,3	96,6 ± 6,3
PGD₂	0,1	78,2 ± 5,1	99,8 ± 4,9	100,9 ± 8,5	99,2 ± 9,2
	3	86,5 ± 3,4	96,2 ± 5,4	90,4 ± 3,2	99,2 ± 3,4
	100	84,3 ± 3,4	95,2 ± 4,3	95,1 ± 2,2	90,8 ± 2,2
	μ	83,0 ± 4,0	97,1 ± 4,9	95,5 ± 4,6	96,4 ± 4,9
TXB₂	0,1	95,5 ± 5,0	96,1 ± 5,7	96,2 ± 12,9	91,0 ± 17,1
	3	98,7 ± 2,3	95,9 ± 2,1	95,3 ± 2,1	89,0 ± 1,4
	100	106,5 ± 2,6	99,6 ± 2,4	99,5 ± 0,6	99,1 ± 4,3
	μ	100,2 ± 3,3	97,2 ± 3,4	97,0 ± 5,2	93,0 ± 7,6
6-keto-PGF_{1α}	0,1	99,8 ± 13,1	99,5 ± 14,4	110,8 ± 15,8	112,7 ± 23,8
	3	100,4 ± 5,0	102,7 ± 6,6	99,9 ± 4,6	93,4 ± 7,0
	100	97,9 ± 4,6	98,0 ± 5,1	99,3 ± 3,5	103,9 ± 4,3
	μ	99,4 ± 7,6	100,1 ± 8,7	103,3 ± 8,0	103,3 ± 11,7
PGF_{2α}	0,1	109,1 ± 9,4	100,3 ± 15,3	103,4 ± 26,8	98,1 ± 18,5
	3	95,6 ± 8,7	99,8 ± 2,4	103,4 ± 7,7	95,1 ± 7,0
	100	90,6 ± 9,9	95,2 ± 7,1	92,1 ± 4,2	93,4 ± 5,0
	μ	98,4 ± 9,3	98,4 ± 8,3	99,6 ± 12,9	95,5 ± 10,2

Tabelle 5-9: Einfrier-Auftau-, Langzeit-, Kurzzeit- und Probenstabilität im Autosampler von Kalibrationsstandards in Humanplasma. Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) ± Standardabweichung (SD).

5.3.6.5 Stabilität der Stammlösungen

Zur Ermittlung der Stabilität der Stammlösung I (je 50.000 ng/ml PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2 α} und 6-keto-PGF_{1 α} in Methanol) unter Raumtemperatur wurden je 50 µl der Stammlösung I 6 Mal in 1,8 ml Glasvials mit Mikroinserten bei 22 ± 1°C und normalem Tageslicht gelagert. Für die Stabilität der internen Standards wurde eine Lösung mit 2500 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 2500 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 2500 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 1000 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1 α} und 1000 ng/ml [²H₄]-PGF_{2 α} in Methanol hergestellt und je 50 µl dieser Stammlösung 6 Mal in 1,8 ml Glasvials mit Mikroinserten bei 22 ± 1°C und normalem Tageslicht gelagert. Nach sechs Stunden wurden die Lösungen auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) verdünnt und gegen eine

frisch hergestellte Standardreihe von PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α}, [²H₄]-PGE₂, [²H₄]-PGD₂, [²H₄]-TXB₂, [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und [²H₄]-PGF_{2α} (5 bis 500 ng/ml) gemessen. 20 µl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Bedingungen hatten keinen Einfluss auf die Konzentration der Stammlösung I und der internen Standardlösung (Tabelle 5-10).

Stabilität der Stammlösungen	
Analyt	$\mu \pm SD$ (%, n = 6)
PGE₂	101,7 ± 5,8
PGD₂	101,2 ± 5,2
TXB₂	96,6 ± 5,1
PGF_{2α}	96,1 ± 7,2
6-keto-PGF_{1α}	98,6 ± 6,1
[²H₄]-PGE₂	101,1 ± 9,6
[²H₄]-PGD₂	98,8 ± 10,8
[²H₄]-TXB₂	102,7 ± 4,7
[²H₄]-6-keto-PGF_{1α}	97,0 ± 6,4
[²H₄]-PGF_{2α}	103,6 ± 8,7

Tabelle 5-10: Stabilität der Stammlösung I (50.000 ng/ml PGE₂, PGD₂, TXB₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} in Methanol) und der internen Standards (2500 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 2500 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 2500 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 1000 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} und 1000 ng/ml [²H₄]-PGF_{2α} in Methanol). Beide Stammlösungen wurden für die Stabilitätsbestimmung auf eine Konzentration von 100 ng/ml mit Acetonitril/Wasser/Ameisensäure (20:80:0,0025, v/v, pH 4,0) verdünnt und 20 µl in das LC-MS/MS-System injiziert.

5.3.7 Ergebnisse der Methodvalidierung

Die Richtigkeit der Methode wurde einmal mit PBS und einmal mit Humanplasma durchgeführt. Beide Matrices sind allerdings nicht ideal. PBS entspricht in seiner Zusammensetzung nicht dem Humanplasma, allerdings enthält Humanplasma permanent Prostaglandine, was eine präzise Methodenentwicklung unmöglich macht.

Für die Richtigkeit der Methode in PBS wurde eine Quantifizierungsgrenze von 0,01 ng/ml für PGE₂, PGD₂ und TXB₂, 0,1 ng/ml für 6-keto-PGF_{1α} und 0,3 ng/ml für PGF_{2α} ermittelt. Da aber alle drei Prostaglandine im Leerplasma enthalten sind, sollte nach FDA die Quantifizierungsgrenze bei einer Verwendung von Plasma für die Kalibration um den Faktor 5 überhalb der Konzentration der Leerwerte sein. Bei Verwendung von Plasma sind dies mindestens 0,04 ng/ml PGE₂ und PGD₂ (Leerwerte ≤ 10 pg/ml) und mindestens 0,5 ng/ml für TXB₂ (Leerwerte ca. 100 pg/ml). Um auf der sicheren Seite zu sein, wurde bei der Verwendung von Plasma zur Kalibration eine Quantifizierungsgrenze von 0,1 ng/ml für PGE₂ und PGD₂ und 1 ng/ml für TXB₂ festgesetzt. Bei diesen Konzentrationen, die um den Faktor 10 über den Basalwerten liegen, ist der Fehler entsprechend gering. Für 6-keto-PGF_{1α} wurde

dementsprechend eine Quantifizierungsgrenze von 1 ng/ml festgesetzt. Für PGF_{2α} musste keine Anpassung der Quantifizierungsgrenze vorgenommen werden, da PGF_{2α} in den Leerwerten nicht beobachtet wurde.

Die Selektivität der Methode wurde während der Bestimmung der Richtigkeit mit Blind- und Doppelblindproben sowohl in Plasma als auch in PBS bestimmt. Im PBS gab es keine Interferenzen zu den Retentionszeiten der Analyten und der internen Standards. Im Humanplasma traten als Interferenzen die Basalwerte der Prostaglandine auf, bei den internen Standards wurden keine koelutierenden Peaks beobachtet.

Aus den Ergebnissen der Richtigkeit und der Präzision ergibt sich als endgültige Quantifizierungsgrenze der Methode für Kalibrationsstandards in PBS von 0,01 ng/ml für PGE₂, PGD₂ und TXB₂, 0,1 ng/ml für 6-keto-PGF_{1α} und 0,3 ng/ml für PGF_{2α}. Sämtliche Daten der Richtigkeit und Präzision entsprechen zwar den Forderungen der FDA, sind aber mit einer gewissen Unsicherheit verbunden, das zur Bestimmung PBS anstatt Humanplasma verwendet wurde.

Die mittlere relative Wiederfindung von PGE₂ betrug 87,1 % ± 12,2 %, von [²H₄]-PGE₂ 88,7 % ± 12,0 %, von PGD₂ 86,2 % ± 10,7 %, von [²H₄]-PGD₂ 86,4 % ± 10,2 %, von TXB₂ 77,1 % ± 12,2 %, von [²H₄]-TXB₂ 73,2 % ± 7,5 %, von PGF_{2α} 64,6 % ± 9,1 %, von [²H₄]-PGF_{2α} 65,5 % ± 5,0 %, von 6-keto-PGF_{1α} 65,7 % ± 5,9 % und von [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} 63,0 % ± 4,7 %. Die mittlere absolute Wiederfindung von PGE₂ betrug 73,1 % ± 15,5 %, von [²H₄]-PGE₂ 76,1 % ± 18,1 %, von PGD₂ 177,7 % ± 21,0 %, von [²H₄]-PGD₂ 177,4 % ± 20,4 %, von TXB₂ 77,4 % ± 10,5 %, von [²H₄]-TXB₂ 76,2 % ± 9,5 %, von PGF_{2α} 63,9 % ± 9,1 %, von [²H₄]-PGF_{2α} 62,7 % ± 9,5 %, von 6-keto-PGF_{1α} 72,3 % ± 8,6 % und von [²H₄]-6-keto-PGF_{1α} 70,9 % ± 8,9 %.

Mit Ausnahme von PGD₂ wurde eine Ionensuppression zwischen 15 und 25 % gefunden. Für PGD₂ wurde wie im mPGES-1-Assay (Kapitel 4) eine Signalverstärkung beobachtet. Da für jeden Analyten ein entsprechender interner Standard zur Verfügung steht, der die gleichen Signal-beeinflussenden Effekte erfährt wie der Analyt selbst, gibt es keine Probleme bei der Quantifizierung.

Während den Stabilitätsuntersuchungen gab es nur zwei Auffälligkeit für PGD₂ bei der Ermittlung der Kurzzeitstabilität und TXB₂ bei Ermittlung der Langzeitstabilität. Dies hat insofern Auswirkungen auf die Probenaufbereitung, dass aufgetaute Plasmen, obwohl mit BHT und EDTA stabilisiert, sehr zügig extrahiert werden sollten, um einen Verlust an PGD₂ während der Aufarbeitung zu vermeiden und Proben, bei denen es auf TXB₂ ankommt, innerhalb von 2 Wochen extrahiert und bestimmt werden sollten.

Die LC-MS/MS-Methode zur Bestimmung von PGE₂, PGD₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} im Humanplasma entspricht in allen Validierungsparametern den Forderungen der FDA.

5.4 Studien

5.4.1 LPS-Stimulation von Humanplasmen in Mutanten des COX-2-Promotors

In Untersuchungen zur Regulation des COX-2-Gens sind viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren vorhanden [131]. Papafili et al. wies 2002 in Bindungsstudien nach, dass der Polymorphismus -765GG → CC im Promotor des COX-2-Gens, der innerhalb einer potentiellen Bindungsdomäne für den Transkriptionsfaktor Sp1 liegt, mit einer geringeren Promotoraktivität (-28 %) einhergeht [131]. In einer klinischen Studie von Cipollone et al. resultierte der Polymorphismus -765GG → CC im Promotor des COX-2-Gens in einem verminderten Herzinfarkt- und Schlaganfallsrisiko und in einer niedrigeren COX-2-Proteinexpression [132]. Nach einer LPS-Stimulation von isolierten Monozyten wurde in Trägern des -765CC-Genotyps eine geringere COX-2-Proteinexpression und entsprechend weniger PGE₂ gefunden (-765GG: $4,25 \pm 0,3$ ng/ml und -765CC: $1,64 \pm 0,2$ ng/ml). Als Grund für das verminderte Infarktrisiko von Trägern des -765CC-Genotyps wurde die verminderte COX-2-Expression in Plaque-Makrophagen postuliert.

In einer Studie untersuchten wir nun den Einfluss des Polymorphismus -765GG → CC auf die COX-2-Aktivität unter Celecoxibgabe. Dazu erhielten alle Probanden (10 Probanden -765GG und 10 Probanden -765CC) 48 h vor Gabe von 200 mg Celecoxib 500 mg Acetylsalicylsäure, um COX-1-Effekte auszuschließen [129]. Den Probanden wurde Blut (Heparin) zum Zeitpunkt 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 9 h und 24 h nach Celecoxibgabe entnommen. Das gewonnene Blut wurde aliquotiert und ein Teil des Blutes für die LPS-Stimulation und ein Teil für die Bestimmung der Celecoxib-Konzentration verwendet. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Frankfurt am Main genehmigt.

Für die LPS-Stimulation wurde 1 ml heparinisiertes Vollblut sofort nach der Gewinnung mit 10 µg/ml LPS (*Escherichia coli* Serotyp, Typ 026:B6) bei 37°C für 24 Stunden inkubiert [129]. Nach der Inkubation wurde das Plasma 10 Minuten bei 3200 g und 4°C zentrifugiert und anschließend gegen eine frisch hergestellte Standardreihe aus PBS quantifiziert. In dem nach LPS-Stimulation gewonnenen Plasma wurden die Prostaglandine und TXB₂ mit einer LC-MS/MS-Methode bestimmt, die allerdings nicht mit der validierten LC-MS/MS-Methode übereinstimmte, da die Methode zu dem Zeitpunkt der Studie noch nicht endgültig entwickelt und validiert war. Der Unterschied zwischen der Methode, wie sie in der Studie verwendet wurde, und der endgültig validierten Methode besteht hauptsächlich in den Menge des eingesetzten BHTs, der Phosphorsäure, des verwendeten Plasmavolumens und den chromatographischen Bedingungen.

Nach einer LPS-Stimulation von Monozyten stieg die Konzentration von PGE₂ von $0,07 \pm 0,12$ ng/ml (LPS-Stimulation) auf $19,3 \pm 7,2$ ng/ml an (Abbildung 5-7). Die PGE₂-Konzentration nahm in dem Maße ab, wie die Plasmakonzentration von Celecoxib anstieg. Zwischen beiden Gruppen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der PGE₂-Konzentrationen festgestellt werden. Neben PGE₂ wurde auch ein Anstieg von TXB₂ und PGF_{2α} nach LPS-Stimulation beobachtet, der in den Gruppen aber

ebenfalls nicht signifikant war. Bestätigt wurden die Ergebnisse für die Prostaglandinlevel auch auf mRNA- und Proteinebene. Real-time-PCR und Western-Blot-Analyse von isolierten Monozyten nach einer LPS-Stimulation von 10 µg/ml ergaben ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen in der COX-2-mRNA-Expression bzw. der COX-2-Genexpression.

Als die Methode endgültig validiert war, wurden die Plasmen einiger Probanden mit der verkürzten LC-MS/MS-Methode nochmals gemessen (Abbildung 5-8). Die Prostaglandinkonzentrationen dieser wiederholten Messungen stimmten mit denen der langen Chromatographie überein (Unterschied < 10 %). Aus beiden Gruppen wurden zudem einige Probanden nachuntersucht, deren Blut mit verschiedenen LPS-Konzentrationen behandelt wurde, um einen Einfluss der verwendeten LPS-Konzentration auf die Ergebnisse auszuschließen. Auch in diesen Plasmen wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet. Die gleichen Ergebnisse wurden erneut auch auf mRNA- und Proteinebene erhalten.

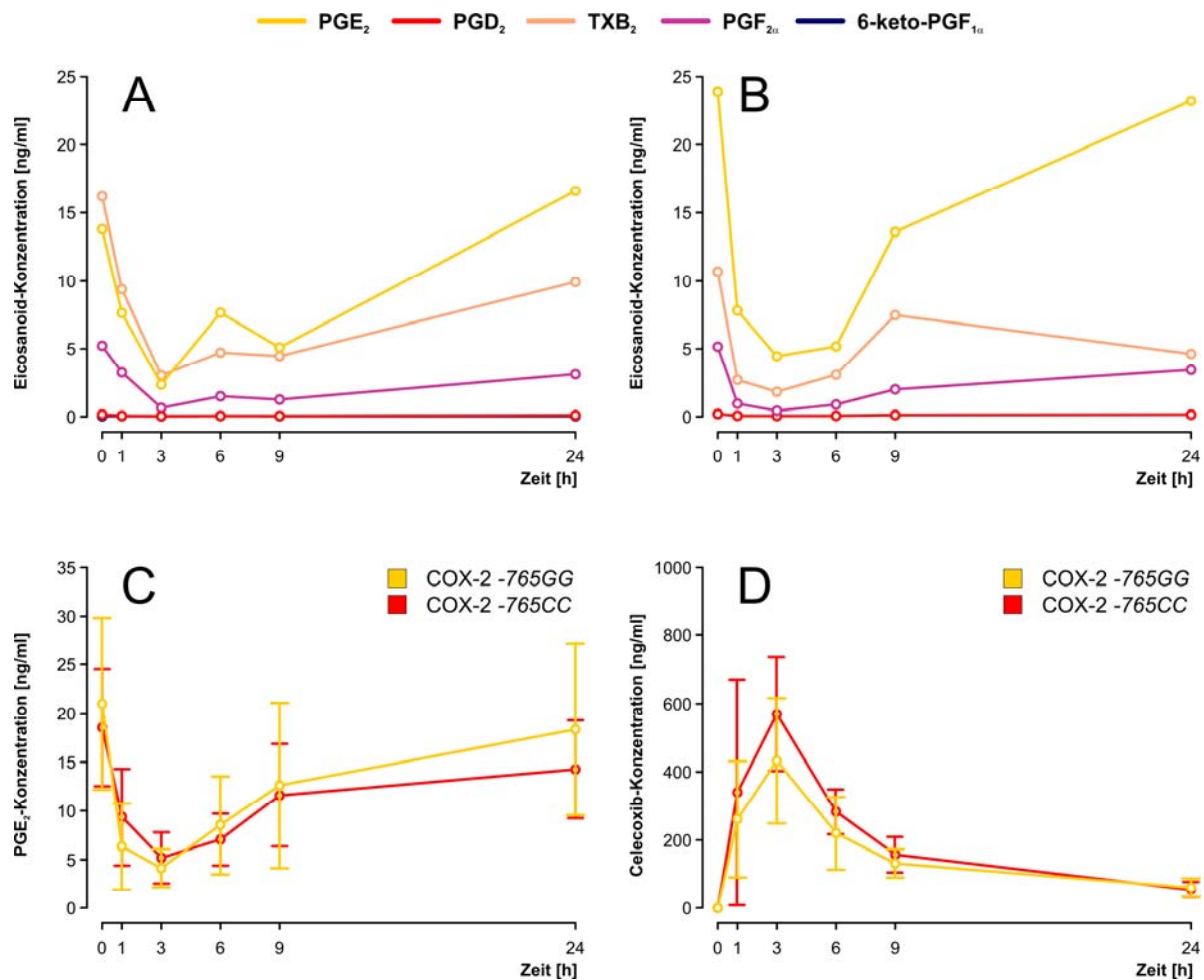


Abbildung 5-7: A. und B. Typische COX-2-Aktivitätskurven nach Celecoxibgabe und LPS-Stimulation (24 h mit 10 µg/ml LPS) von 2 Probanden nach 24 h Behandlung mit 10 µg/ml LPS. Dargestellt wurden alle 5 Prostaglandine. 6-keto-PGF_{1α} wurde nur in Chromatogramm A detektiert. **C.** Mittelwerte ± Standardabweichung der COX-2-Aktivitätskurven nach Celecoxibgabe und nach LPS-Stimulation von -765GG und -765CC-Mutanten

(n = 10). **D.** Mittelwerte \pm Standardabweichung der Celecoxib-Konzentrationen von -765GG und -765CC-Mutanten (n = 10).

Nach Beendigung der Studie konnte weder in der COX-2-mRNA-Expression, in der COX-2-Protein-Expression oder der COX-2-Aktivität ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen beobachtet werden. Die Ergebnisse stehen daher im Widerspruch zu der von Cipollone durchgeführten Studie [132], in der in -765CC-Trägern weniger PGE₂ gefunden wurde (-765GG: $4,25 \pm 0,3$ ng/ml und -765CC: $1,64 \pm 0,2$ ng/ml), und zu einer polnischen Asthmastudie [133], in der in -765CC-Trägern sogar mehr PGE₂ gefunden wurde (-765GG: 3,09 ng/ml und -765CC: 0,25 ng/ml).

Sämtliche Studien zeigen, dass der Polymorphismus -765GG \rightarrow CC bisher noch nicht völlig verstanden wird. Obwohl dieser Polymorphismus innerhalb einer potentiellen Sp1-Bindungsdomäne des COX-2-Promotors liegt und Sp1 als Transkriptionsaktivator bekannt ist [134], scheint die Regulation des COX-2-Gens wesentlich komplexer zu sein und noch andere Polymorphismen eine Rolle zu spielen.

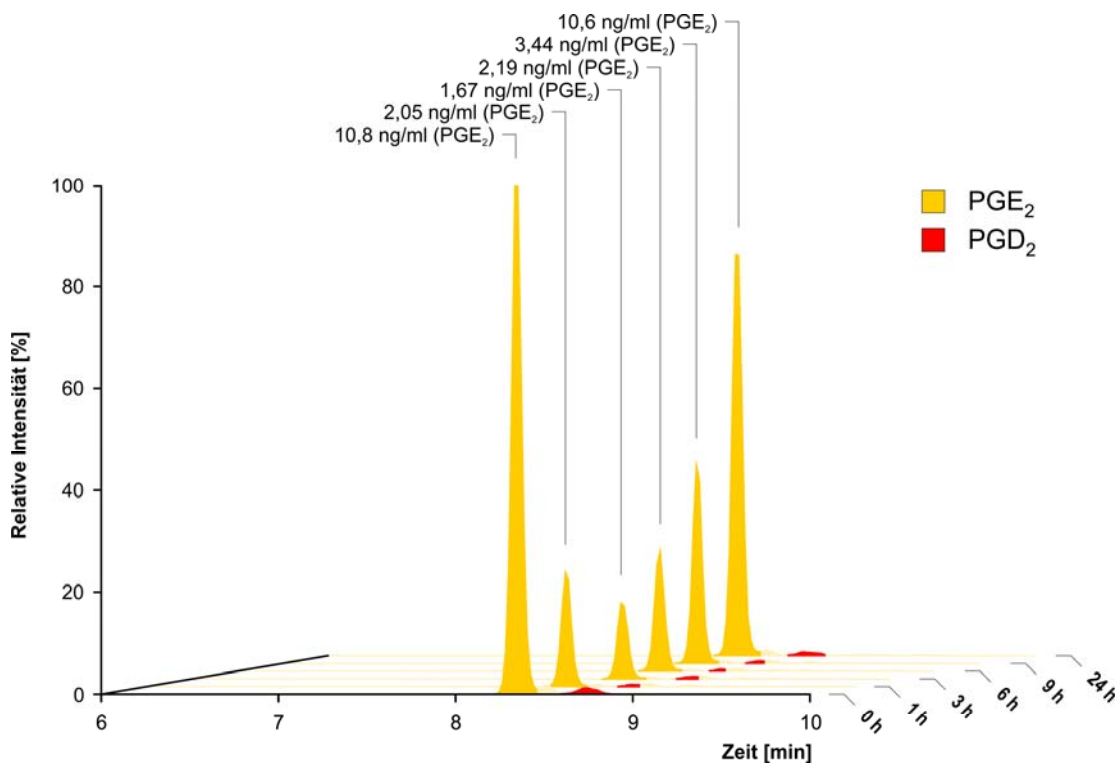


Abbildung 5-8: Typische PGE₂-Chromatogramme nach Celecoxibgabe und LPS-Stimulation (24 h mit 10 μ g/ml LPS) eines Probanden. Als Massenübergang wurde m/z 351 \rightarrow m/z 271 verwendet.

5.4.1.1 Probenaufarbeitung

150 μ l Humanplasma wurden mit 20 μ l interner Standard-Lösung (25 ng/ml [²H₄]-PGE₂, 25 ng/ml [²H₄]-PGD₂, 25 ng/ml [²H₄]-TXB₂, 10 ng/ml [²H₄]-6-keto-PGF_{1 α} und 10 ng/ml [²H₄]-PGF_{2 α} in Methanol), 20 μ l Methanol, 5 μ l BHT (2 mg/ml in Methanol), 5 μ l EDTA (2 mg/ml in H₂O) und 800 μ l 35

mM H₃PO₄ versetzt, geschüttelt, zentrifugiert und mit absolut-Nexus-SPE-Kartuschen nach dem Protokoll in 5.2.5 extrahiert und in 50 µl Acetonitril/Wasser/Essigsäure (30:70:0,0025, v/v, pH 4,1) aufgenommen. Für die Herstellung der Standardreihen wurde 150 µl PBS anstatt Humanplasma verwendet und die Standardreihen genauso extrahiert wie die Proben.

40 µl wurden in das LC-MS/MS-System injiziert. Als mobile Phase A wurde Wasser/Essigsäure (100:0,0025, v/v, pH 4,0) und Acetonitril/Essigsäure (100:0,0025, v/v) als mobile Phase B eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 400 µl/min. Der angewendete Gradient ist in Tabelle 5-11 beschrieben. Die Retentionszeiten von PGE₂, PGD₂, TXB₂, 6-keto-PGF_{1α} und PGF_{2α} betrugen 24,1, 25,5, 19,8, 14,0 und 22,2 min.

Zeitpunkt	Mobile Phase A	Mobile Phase B
0 min	80%	20%
27 min	62%	38%
29 min	55%	45%
31 min	10%	90%
34 min	10%	90%
36 min	80%	20%
39 min	80%	20%

Tabelle 5-11: Gradientenzusammensetzung in der COX-2-Studie. Als mobile Phase A wurde Wasser/Ameisensäure (100:0,0025, v/v, pH 4,0) und Acetonitril/Ameisensäure (100:0,0025, v/v) als mobile Phase B eingesetzt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 400 µl/min und das Injektionsvolumen 40 µl.

5.4.2 Vergleich von Immunoassay und LC-MS/MS

Für einen Vergleich der Ergebnisse von ELISA und LC-MS/MS wurde frisches Vollblut gewonnen und Aliquots von 500 µl mit 10 µg/ml LPS und 5 µl verschiedener Celecoxib-Konzentrationen in DMSO für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Plasma durch Zentrifugation gewonnen und ein Teil davon nach dem Protokoll in 5.2.5 extrahiert und die Konzentration der Prostaglandine und TXB₂ mit der LC-MS/MS-Methode bestimmt. Vom restlichen Teil des Plasmas wurde die PGE₂-Konzentration der verschiedenen Proben mit einem handelsüblichen PGE₂-ELISA (Prostaglandin E₂ *Enzyme Immuno Kit* von Assay Designs, Katalog-Nummer 900-001) bestimmt. Dazu wurde das beigefügte Protokoll befolgt und das Plasma in einer Verdünnung von 1:100 in ELISA-Puffer für den ELISA-Kit verwendet.

Beim Vergleich der Ergebnisse für den PGE₂-ELISA und der validierten LC-MS/MS-Methode fällt auf, dass mit dem PGE₂-ELISA insgesamt wesentlich höhere PGE₂-Konzentrationen gemessen werden. Je kleiner die Konzentration ist, die mit dem PGE₂-ELISA gemessen wird, umso größer wird die Standardabweichung der Messwerte. Sehr auffällig sind die Proben der Negativkontrollen, die nicht mit LPS und Celecoxib behandelt wurden. Der ELISA liefert hier extrem hohe Konzentrationen von 6 ng/ml, die um den Faktor 60 gegenüber der LC-MS/MS-Methode (0,1 ng/ml) liegen. Der verwendete

PGE₂-ELISA kann im Fall von LPS-stimuliertem Plasma nur Tendenzen liefern, aber keine exakten und präzisen Werte. Der IC₅₀ von Celecoxib beträgt ca. 1 µM und entspricht den Literaturdaten [135].

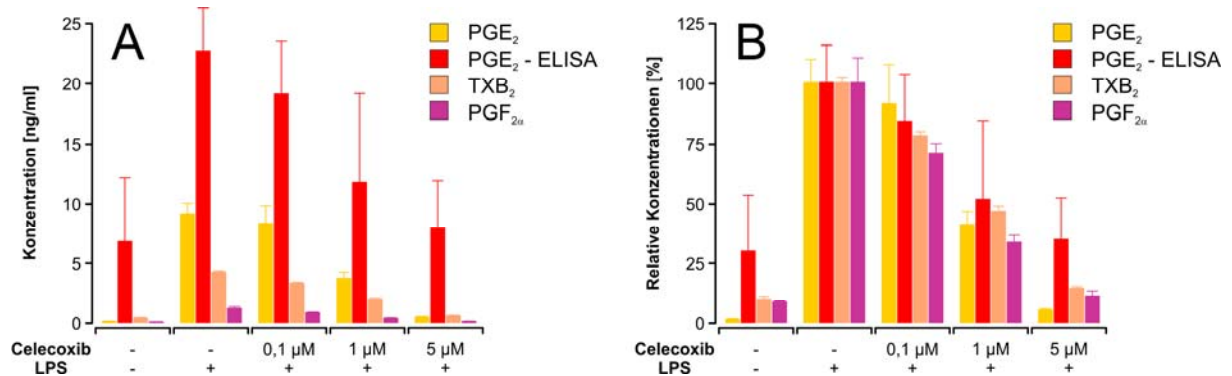


Abbildung 5-8: Vergleich der Ergebnisse eines *ex-vivo*-Assays mit LC-MS/MS und einem PGE₂-ELISA (Prostaglandin E₂ *Enzyme Immuno Kit* von Assay Designs, Katalog-Nummer 900-001). Diagramm A zeigt die absolut gemessenen Konzentrationen in ng/ml. 6-keto-PGF_{1α} konnte nicht detektiert werden. Diagramm B zeigt die gleichen Konzentrationen wie Diagramm A, nur wurde jede Gruppe auf 100 % normalisiert. Dazu wurde die höchste Konzentration in einer Gruppe verwendet. Angegeben wurden die Mittelwerte (μ) \pm Standardabweichungen (*SD*) (*n* = 3).

5.5 Diskussion und Zusammenfassung

Nachdem 1990 die induzierbare COX-2 nach einer LPS-Stimulation von Monozyten entdeckt wurde, begann Patrignani *in vitro*- und *ex vivo*-Assays zu entwickeln, um die COX-2-Aktivität zu bestimmen [129]. Der *ex-vivo*-Assay basiert auf der Verwendung von humanem Vollblut, dass zusammen mit 10 µg/ml LPS für 24 Stunden inkubiert wird. Nach Gewinnung des Plasmas wurde die PGE₂-Konzentration mit einem selbst entwickelten Immunoassay bestimmt. Typische PGE₂-Plasmakonzentrationen nach LPS-Stimulation liegen zwischen 15 und 20 ng/ml.

Da die Daten von Patrignani auf einem PGE₂-Immunoassay basieren, sollte eine LC-MS/MS-Methode entwickelt werden, mit der die Primärprostaglandine PGE₂, PGD₂, PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} und das Thromboxan TXB₂ selektiv und sensitiv in Humanplasma nach LPS-Stimulation bestimmt werden können. Die Quantifizierungsgrenze der Methode sollte auch so niedrig sein, dass die Prostaglandine auch in unstimuliertem Plasma gemessen werden können. Für sämtliche 5 Prostaglandine musste so eine Empfindlichkeit von wenigen pg/ml im Plasma angestrebt werden [130].

Obwohl bereits in Kapitel 4 eine Festphasenextraktion entwickelt wurde, war diese aufgrund niedriger Wiederfindungsraten nicht für die Extraktion von Humanplasma geeignet, weshalb die Methode modifiziert werden musste. Durch den Einsatz von 45 mM Phosphorsäure und den Wechsel des Kartuschen-Materials konnte eine akzeptable Wiederfindung für alle 5 Prostaglandine erreicht werden.

Da Prostaglandine bereits im Leerplasma vorhanden sind, gibt es nur die Möglichkeit eines Standardadditionsverfahrens oder der Verwendung eines Plasmaersatz, z.B. PBS. Aufgrund des großen dynamischen Bereichs der zu entwickelnden Methode (0,01 ng/ml bis 100 ng/ml für PGE₂ = 5 Dekaden) war eine Standardaddition mit linearer Regression nicht durchführbar. Außerdem stellt das Standardadditionsverfahren ein Extrapolationsverfahren dar, bei dem der Fehler bei niedrigen Prostaglandinkonzentrationen (0,01 ng/ml PGE₂) extrem groß wird. In einem Vorversuch und der Bestimmung der Richtigkeit wurde gezeigt, dass Standardreihen in PBS und in Humanplasma nahezu übereinander liegen und PBS prinzipiell als Plasmaersatz verwendet werden kann. Die FDA fordert, dass eine Validierung in der Leermatrix durchzuführen ist, aus denen der Analyt auch in den realen Proben extrahiert werden soll. Dies ist im Falle von Prostaglandinen und Humanplasma leider nicht möglich. Trotzdem wurde versucht, so weit es möglich war, in der Validierung Humanplasma einzusetzen, auch wenn dadurch bei geringen Konzentrationen ein Fehler in die Validierung mit einfließt.

Für die Methodenentwicklung wurde zunächst Humanplasma des benachbarten Blutspendezentrum Hessens (Frankfurt) verwendet, doch dieses enthielt unphysiologische hohe Prostaglandinkonzentrationen und kam nicht für eine Methodenvalidierung in Frage. Deswegen wurde von 3 männlichen und 3 weiblichen Freiwilligen frisches Heparinplasma gewonnen, das für die Methodenvalidierung verwendet wurde.

Die Methode wurde, so weit möglich, nach FDA-Kriterien validiert und liefert eine Quantifizierungsgrenze bei der Verwendung von PBS von 0,01 ng/ml für PGE₂, PGD₂ und TXB₂, 0,1 ng/ml für 6-keto-PGF_{1α} und 0,3 ng/ml für PGF_{2α}.

Zur Bestimmung der Prostaglandin-Konzentrationen in der COX-2-Studie wurde eine andere HPLC-Methode verwendet, als in der endgültig validierten Methode. Als die COX-2-Studie bereits begonnen hatte, befand sich die LC-MS/MS-Methode noch im Entwicklungsstadium und konnte erst nach Abschluss der Studie fertig gestellt werden. Die in der Studie verwendete Methode unterschied sich vor allem in den chromatographischen Bedingungen. Im Laufe der Methodenentwicklung wurde die Chromatographie von 38 Minuten auf 16 Minuten reduziert. Der Grund für diese lange Chromatographie war der Versuch so viele Prostaglandine wie möglich in der LC-MS/MS-Methode zu quantifizieren. PGA₂, PGB₂, PGJ₂ und Δ¹²-PGJ₂ besitzen bei kurzen LC-MS/MS-Methoden die gleiche Retentionszeit und können nur durch eine sehr lange Chromatographie voneinander getrennt werden. Da dies mit der langen Chromatographie nur in Ansätzen gelang, wurde die Methode wieder auf kürzere Laufzeiten umgestellt.

In der Studie wurde der Einfluss von Celecoxib auf die PGE₂-Konzentration im LPS-stimulierten Plasma von Mutanten des COX-2-Promotors untersucht. Nach Literaturangaben sollte eigentlich ein Unterschied zwischen beiden Gruppen sichtbar sein, doch in beiden Gruppen wurden die gleichen PGE₂-Spiegel beobachtet. Daraufhin wurde die COX-2-mRNA und die COX-2-Proteinexpression untersucht. Zwischen beiden Gruppen waren ebenfalls keine Unterschiede sichtbar. Nachdem die Studie abgeschlossen war, wurden noch zahlreiche Probanden mit der endgültig validierten Methode untersucht, deren Plasmen im Gegensatz zur Studie mit verschiedenen LPS-Konzentrationen inkubiert wurden. Auch diese Plasmen unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen.

Im direkten Vergleich zwischen der validierten LC-MS/MS-Methode und einem handelsüblichen PGE₂-Immunoassay war der Immunoassay eigentlich nicht für die Bestimmung von PGE₂ geeignet. Zum einen waren die PGE₂-Konzentrationen wesentlich höher als in der LC-MS/MS-Methode, zweitens nahmen die Standardabweichungen mit niedrigeren PGE₂-Konzentrationen extrem zu und drittens lag der Leerwert der unbehandelten Proben um den Faktor 60 höher als bei der LC-MS/MS-Methode und sogar im unphysiologischen Bereich. Im Falle von LPS-stimuliertem Plasma ist der PGE₂-Immunoassay unbrauchbar.

Die Quantifizierungsgrenzen der validierten LC-MS/MS-Methode sind nur bei TXB₂ niedrig genug, um damit physiologische Prostaglandin-Konzentrationen in Humanplasma bestimmen zu können, die Quantifizierungsgrenze für PGE₂ liegt am oberen Ende der physiologischen Konzentrationen und für PGF_{2α} und 6-keto-PGF_{1α} konnte das Ziel, physiologische Konzentrationen zu bestimmen, nicht erreicht werden.

6. Zusammenfassung

LC-MS/MS-Systeme haben sich in den vergangenen Jahren trotz der hohen Anschaffungskosten von mehreren hunderttausend Euro zu einer Standardmethode in analytischen Laboratorien entwickelt und bieten im Vergleich zu herkömmlicher HPLC mit UV- und Fluoreszenz-Detektoren eine höhere Sensitivität und bessere Selektivität. Aufgrund dieser Vorteile war es das Ziel dieser Arbeit, verschiedene LC-MS/MS-Methoden zu entwickeln, mit der Eicosanoide sensitiv und selektiv in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten quantifiziert werden können und diese Assays dann in biologischen Fragestellungen einzusetzen.

Ein Problem der Eicosanoidanalytik mittels LC-MS/MS besteht in der Strukturähnlichkeit vieler Prostaglandine, die große Schwierigkeiten während einer Methodenentwicklung verursachen. Zwei sehr wichtige Prostaglandine, PGE₂ und PGD₂, besitzen das gleiche Fragmentspektrum und können nicht über das Selektionsprinzip des Tandem-Massenspektrometers quantifiziert werden, sondern müssen vor der Detektion chromatographisch getrennt werden. Die chromatographischen Bedingungen, die für eine Trennung von PGE₂ und PGD₂ nötig sind, gehen allerdings mit einem erheblichen Empfindlichkeitsverlust des Massenspektrometers einher. Die beste Empfindlichkeit wurde mit einem neu entwickelten Säulenmaterial, Synergi Hydro-RP, erreicht, was in allen entwickelten Methoden verwendet wurde.

Zur Quantifizierung von PGE₂ und PGD₂ in Mikrodialysaten (max. Volumen 75 µl) musste eine Empfindlichkeit von mindestens 40 pg/ml PGE₂ erreicht werden. Nach der Validierung des Systems konnte eine Quantifizierungsgrenze von PGE₂ und PGD₂ von 25 pg/ml bzw. 50 pg/ml erreicht werden. Bei Formalin-behandelten Ratten stieg PGE₂ innerhalb von 15 Minuten auf 380 pg/ml an, womit frühere Ergebnisse, die auf der Verwendung von Immunoassays basieren, bestätigt werden konnten. Für PGD₂ konnte kein Unterschied zu Kontroll-Ratten festgestellt werden und ist deswegen im Gegensatz zu PGE₂ nicht an der Nozizeption im untersuchten Modell beteiligt.

Mit Hilfe des mPGES-1-Enzym-Assays wurde mPGES-1 als ein weiteres Target für die drei COX-Inhibitoren Celecoxib, R- und S-Flurbiprofen identifiziert. Da mit Celecoxib ab einer Konzentration von 100 µM keine weitere Hemmung der mPGES-1 erreicht werden kann, hemmt Celecoxib die mPGES-1 wohl nicht kompetitiv und bindet nicht im katalytischen Zentrum der mPGES-1. Für Rofecoxib und Paracetamol konnte keine Hemmung der mPGES-1 festgestellt werden.

Während der Methodenentwicklung wurde ein Störpeak zwischen PGE₂ und PGD₂ beobachtet, der in den Versuchen immer im gleichen Verhältnis zu PGE₂ gebildet wurde. Mit Hilfe eines Fingerprints wurde dieser Störpeak als 5-trans-PGE₂ identifiziert, welches ein bisher nicht beschriebenes Nebenprodukt der mPGES-1 zu sein scheint.

In der letzten Methode sollte eine Methode entwickelt werden, mit der PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, 6-keto-PGF_{1α} und TXB₂ in Humanplasma bestimmt werden können. Im direkten Vergleich war die validierte

LC-MS/MS-Methode einem handelsüblichen Immunoassay überlegen. Zum einen waren die Standardabweichungen der LC-MS/MS-Methode wesentlich niedriger und zum anderen waren die Basalwerte des Immunoassays unphysiologisch hoch.

In einer Studie wurde der Einfluss einer Mutation (-765G → C) im Promotor der COX-2 auf die COX-2-Aktivität untersucht, für die eine reduzierte COX-2-Expression um den Faktor 2 in Monozyten beschrieben wurde. Zwischen den 2 Gruppen konnten weder in den Prostaglandin-Konzentrationen, der COX-2-mRNA-Expression noch in der COX-2-Protein-Expression statistische Unterschiede festgestellt werden und stehen damit im Widerspruch zu bisherigen Veröffentlichungen.

Die entwickelten LC-MS/MS-Methoden ermöglichen eine bessere Sensitivität und schnellere Analysenzeiten im Vergleich zur HPLC und durch ihre gute Sensitivität kann der Einsatz von problematischen Immunoassays vermieden werden. Im Falle der Mikrodialysemethode, wo PGE₂ in einer relativ einfachen Matrix bestimmt werden sollte (ACSF), liefert die LC-MS/MS-Methode die gleichen Ergebnisse. Im Falle von Humanplasma ist der Immunoassay allerdings unbrauchbar. Ein weiterer Vorteil der LC-MS/MS-Methoden gegenüber Immunoassays besteht darin, dass mehrere Prostaglandine in einer einzigen Probe bestimmt werden können. Gegenüber GC-MS und GC-MS/MS-Methoden fehlt den LC-MS/MS-Methoden zwar einiges an Empfindlichkeit, allerdings wird hierfür keine Derivatisierung benötigt.

7. Material

7.1 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Qualität	Hersteller
[² H ₄]-Prostaglandin A ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,1293 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-Prostaglandin B ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,0427 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-Prostaglandin D ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,9967 % Isotopenreinheit Charge 2: 99,9918 % Isotopenreinheit Charge 3: 99,9892 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]- Prostaglandin E ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,0278 % Isotopenreinheit Charge 2: 99,9908 % Isotopenreinheit Charge 3: 99,9925 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-Prostaglandin F _{2α} Isotopenreinheit Charge 1: 99,1167 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-11-dehydro-Thromboxan B ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,9141 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-15d-Prostaglandin J ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,0639 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-6-keto-Prostaglandin F _{1α} Isotopenreinheit Charge 1: 98,8789 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
[² H ₄]-Thromboxan B ₂ Isotopenreinheit Charge 1: 99,9670 %		Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
11-dehydro-Thromboxan B ₂	> 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
12(S)-HHT	> 97 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin D ₂	> 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
13,14-dihydro-15-keto-Prostaglandin E ₂	> 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
15(R)-Lipoxin A ₄	> 98 %	Calbiochem-Novabiochem, Schwalbach/Ts.
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin D ₂	> 95 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin J ₂	> 97 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
6-keto-Prostaglandin F _{1α}	> 99 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Aceton	p.A.	Merck, Darmstadt
Acetonitril	HPLC	J.T.Baker, Deventer, NL
Acetonitril, Lichrosolv	LC/MS	Merck, Darmstadt
Acetonitril	LC/MS	Carl Roth, Karlsruhe
Acetonitril, Lichrosolv	HPLC	Merck, Darmstadt
Ameisensäure, 88-91 %	p.A.	Merck, Darmstadt
Ammoniaklösung, 25 %	LC/MS	Merck, Darmstadt
Ammoniaklösung, 25 %	p.A.	Merck, Darmstadt
Ammoniumacetat	p.A.	Fluka, Seelze
C ₂ H ₇ NO ₂ , M = 77,08 g/mol		
Buttersäure	p.A.	Merck, Darmstadt
Butylhydroxytoluol (BHT)	p.A.	Sigma, Seelze
C ₁₅ H ₂₄ O, M = 220,36 g/mol		
Calciumchlorid-Dihydrat	p.A.	Fluka, Seelze
CaCl ₂ · 2 H ₂ O, M = 147,01 g/mol		
Celecoxib	99,1 %	Witega, Berlin
Chloroform	p.A.	Merck, Darmstadt
Complete TM Mini, EDTA-frei		Roche, Mannheim

Cyclohexan	p.A.	Merck, Darmstadt
D-(+)-Glucose, wasserfrei	p.A.	Fluka, Seelze
$C_6H_{12}O_6$, M = 180,16 g/mol		
Dichlormethan	p.A.	Merck, Darmstadt
Diethylether	p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
Di-isopropylether	p.A.	Merck, Darmstadt
Di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	p.A.	Fluka, Seelze
K_2HPO_4 , M = 174,18 g/mol		
Dimethylsulfoxid	p.A.	Fisher Scientific, Leicestershire, UK
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	p.A.	Fluka, Seelze
$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$, M = 177,99 g/mol		
Di-Natriummethyldiamintetraacetat-Dihydrat	p.A.	Carl Roth, Karlsruhe
$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2 H_2O$, M = 372,24 g/mol		
Eisen-(II)-chlorid-Tetrahydrat	p.A.	Merck, Darmstadt
$FeCl_2 \cdot 4 H_2O$, M = 198,83 g/mol		
Essigsäure	p.A.	KMF Laborchemie, Lohmar
Ethanol	HPLC	Merck, Darmstadt
Ethylacetat	p.A.	Fluka, Seelze
Formalin-Lösung		Krankenhausapotheke am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Glutathion, reduziert (GSH)	p.A.	Merck, Darmstadt
$C_{10}H_{17}N_3O_6S$, M = 307,33 g/mol		
Heptan	p.A.	Merck, Darmstadt
Hexan	p.A.	Merck, Darmstadt
Isofluran		Abbott GmbH, Wiesbaden
Isopropanol	HPLC	Applichem, Darmstadt
Kaliumchlorid	p.A.	Fluka, Seelze
KCl, M = 74,55 g/mol		
Kaliumdihydrogensphosphat	p.A.	Fluka, Seelze
KH_2PO_4 , M = 136,09 g/mol		
Ketamin		Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen
Luft zur medizinischen Anwendung	Ph. Eur.	Hausversorgung des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	p.A.	Fluka, Seelze
$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$, M = 203,30 g/mol		
Methanol	HPLC	J.T.Baker, Deventer, NL
Methanol, Lichrosolv	HPLC	Merck, Darmstadt
MK-886	99 %	Biomol, Hamburg
Natriumchlorid	p.A.	Fluka, Seelze
NaCl, 58,44 g/mol		
Natriumchlorid-Lösung, 0,9 %, steril		B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Natriumhydrogencarbonat	p.A.	Fluka, Seelze
$NaHCO_3$, M = 84,01 g/mol		
Paracetamol	p.A.	Sigma, Seelze
PBS		Gibco, Paisley, UK
Ortho-Phosphorsäure, 85 %	p.A.	Riedel-De-Haën, Seelze
H_3PO_4 , M = 97,99 g/mol, ρ = 1,71 g/ml		
Prostaglandin A_2	> 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin B_2	> 99 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin D_2	> 99 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin E_2	> 99 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin $F_{2\alpha}$	> 99 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin G_2	> 95 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
Prostaglandin H_2	> 95 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA Larodan Fine Chemicals, Malmö, SE
Prostaglandin J_2	> 95 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachussets, USA
R-Flurbiprofen	> 99 %	PAZ-Pharma F & E GmbH, Bad Oeynhausen

Rofecoxib	> 99 %	Witega, Berlin
Sauerstoff	2.0	Messer Group, Sulzbach/Ts.
S-Flurbiprofen	> 99 %	PAZ-Pharma F & E GmbH, Bad Oeynhausen
Stickstoff	5.0	Air Liquide, Düsseldorf
Stickstoff	technisch	Air Liquide, Düsseldorf
tert-Butylmethylether	p.A.	Merck, Darmstadt
Tetrahydrofuran, LiChrosolv	HPLC	Merck, Darmstadt
Thromboxan B ₂	> 99 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachusetts, USA
Toluol	HPLC	Merck, Darmstadt
Wasser	HPLC	J.T.Baker, Deventer, NL
Wasser	LC/MS	Carl Roth, Karlsruhe
Wasser aus MilliQ-Anlage		Millipore, Schwalbach
Wasser, Lichrosolv	HPLC	Merck, Darmstadt
Xylazin		Bayer AG, Leverkusen
Zitronensäure, wasserfrei C ₆ H ₈ O ₇ , M = 192,13 g/mol	p.A.	Merck, Darmstadt
Δ ¹² -Prostaglandin D ₂	> 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachusetts, USA
Δ ¹² -Prostaglandin J ₂	> 98 %	Cayman Chemicals, Ann Arbor, Massachusetts, USA

7.1.1 Künstlicher Liquor (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)

676,15 mg NaCl, 193,9 mg KCl, 183 mg MgCl₂ · 6 H₂O, 1766 mg NaHCO₃, 445 mg Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 191,1 mg CaCl₂ · 2 H₂O und 693,6 mg D-(+)-Glucose werden bei 37°C in einem Liter destilliertem Wasser (Millipore, MilliQ-Anlage) gelöst und mit CO₂:O₂ (5:95) auf pH 7,4 eingestellt.

7.1.2 mPGES-1-Assay-Lösung

Lösung A – 0,1 M FeCl₂

0,199 g Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat werden in einem 10 ml Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt. Die Lösung wurde jeweils frisch hergestellt.

Lösung B – 2 M Zitronensäure

19,21 g Zitronensäure werden in einem 50 ml Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt und bei Raumtemperatur in einem Glasgefäß gelagert.

Lösung C – 250 mM Glutathion

0,154 g Glutathion (GSH) werden in 2 ml Wasser (Baker) gelöst und in Portionen zu je 110 µl bei -20°C in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

Lösung D – 0,2 M Kaliumdihydrogenphosphat

27,2 g Kaliumdihydrogenphosphat werden in einem 1 l Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Lösung E – 0,2 M Dikaliumhydrogenphosphat

45,6 g Dikaliumhydrogenphosphat werden in einem 1 l Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert.

Lösung F – 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4

19 ml Lösung D und 81 ml Lösung E werden in einem 200 ml Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt, der pH-Wert kontrolliert und in einem Glasgefäß bei Raumtemperatur gelagert. Für die Herstellung der mPGES-1-Assay-Lösung wird 1 Tablette Complete™ Mini, EDTA-frei, in 10 ml Lösung F (0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4) gelöst und anschließend 4,0 ml Lösung A (0,1 M FeCl₂), 0,4 ml Lösung B (2 M Zitronensäure), 100 µl Lösung C (250 mM Glutathion), 5,6 ml Wasser (Baker) und 100 µl DMSO versetzt.

7.1.3 0,15 M EDTA

5,58 g Di-Natriumethylendiamintetraacetat-Dihydrat werden in einem 100 ml Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt und in einem Glasgefäß bei Raumtemperatur gelagert.

7.1.4 45 mM Phosphorsäure

1,289 ml Phosphorsäure (85 %) werden in einem 500 ml Messkolben mit Wasser (Baker) bis zur Eichmarke aufgefüllt und bei Raumtemperatur gelagert. Der pH-Wert der Lösung betrug 2,0.

7.2 Materialien

Probenaufarbeitung

Oasis HLB, 30 mg, 1 ml
absolut Nexus, 30 mg, 1 ml

Hersteller

Waters, Eschborn
Varian, Darmstadt

Chromatographie

Hydro RP, 150 mm · 2 mm, Partikelgröße 4 µm, Porengröße 80 Å
Security Guard mit Aqua-C₁₈-Vorsäule, 4 mm · 2 mm, Partikelgröße 10 µm; Porengröße 125 Å

Hersteller

Phenomenex, Aschaffenburg
Phenomenex, Aschaffenburg

7.3 Geräte

Probenaufbereitung

Chromabond® - Vakuumkammer für max. 16 SPE-Säulen
Membranvakuumpumpe
Verdampfer für max. 36 Reaktionsgefäße (≤ 2 ml)
Zentrifuge Biofuge A, Rotor 1378
Zentrifuge Eppendorf 5810 R, Rotor A-4-62
Ultraschallbad

Hersteller

Macherey-Nagel, Düren
Vacuubrand, Wertheim
Barkey, Leopoldshöhe
Heraeus Sepatech, Hanau
Eppendorf, Hamburg
Merck, Darmstadt

Anlage I (API 3000)

Pumpe, PU-1585
Vakuumentgaser, DG-1580-33
Ternärer Gradientenmischer, LG-1580-02
Autosampler, AS-1550

Hersteller

Jasco, Groß-Umstadt
Jasco, Groß-Umstadt
Jasco, Groß-Umstadt
Jasco, Groß-Umstadt

Ionenquelle, TurboIonSpray für API 3000
Tandem-Massenspektrometer, API 3000
Stickstoffgenerator
Spritzenpumpe, Harvard Pump 11 Plus

Applied Biosystems, Darmstadt
Applied Biosystems, Darmstadt
Parker, Kaarst
Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA

Anlage II (API 4000)

Binärpumpe, Serie 1100
Vakuumengaser, Serie 1100
Kontrollmodul, Serie 1100
Autosampler, HTC PAL
Spritze für Autosampler, 20 µl
Spritze für Autosampler, 100 µl Leap
10-Wege-Ventil
Ionenquelle, Turbo-V-Spray
ESI-Probe
Tandem-Massenspektrometer, API 4000
Stickstoffgenerator, NGM-22
Spritzenpumpe, Harvard Pump 11 Plus

Hersteller

Agilent, Böblingen
Agilent, Böblingen
Agilent, Böblingen
CTC Analytics, Zwingen, CH
CTC Analytics, Zwingen, CH
Hamilton Company, Reno, Nevada, USA
VICI International, Schenk, CH
Applied Biosystems, Darmstadt
Applied Biosystems, Darmstadt
Applied Biosystems, Darmstadt
cmc-Instruments GmbH, Eschborn
Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA

7.4 Software

Der HPLC-Teil der Anlage I (API 3000) wurde mit Jasco-Borwin Version 1.50 und das Tandem-Massenspektrometer der Anlage I (API 3000) mit Analyst Version 1.1 (Applied Biosystems, Darmstadt) gesteuert. Die Datenauswertung erfolgte mit Analyst Version 1.1 und Excel XP.

Im Gegensatz zu Anlage I (API 3000) konnte die komplette Anlage II (API 4000) mit Analyst Version 1.4 gesteuert werden. Die Datenauswertung erfolgte mit Analyst Version 1.4 und Excel XP.

8. Literatur

- [1] Geisslinger G., Muth-Selbach U., Coste O., Vetter G., Schrodter A., Schaible H.G., Brune K. and Tegeder I. (2000) Inhibition of noxious stimulus-induced spinal prostaglandin E2 release by flurbiprofen enantiomers: a microdialysis study. *J Neurochem* 74 (5):2094-2100.
- [2] Svensson C.I. and Yaksh T.L. (2002) The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:553-583.
- [3] Woolf C.J. (2004) Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Ann Intern Med* 140 (6):441-451.
- [4] Meßlinger K. (2002) Physiologie und Pathophysiologie der Schmerzentstehung. *Manuelle Med* 40:13-21.
- [5] Scholz J. and Woolf C.J. (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci* 5 Suppl:1062-1067.
- [6] Vane J.R. and Botting R.M. (2003) The mechanism of action of aspirin. *Thromb Res* 110 (5-6):255-258.
- [7] Vane J.R. (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231 (25):232-235.
- [8] Ferreira S.H. (1972) Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. *Nat New Biol* 240 (102):200-203.
- [9] Ferreira S.H., Moncada S. and Vane J.R. (1973) Prostaglandins and the mechanism of analgesia produced by aspirin-like drugs. *Br J Pharmacol* 49 (1):86-97.
- [10] Kurzrok R. and Lieb C.C. (1930) Biochemical studies of human semen. The biological action of semen on the human uterus. *Proc Soc Exp Biol Med* 28:268-272.
- [11] Goldblatt M.W. (1933) A depressor substance in seminal fluid. *Chem Ind* 52:1056-1057.
- [12] Goldblatt M.W. (1935) Properties of human seminal plasma. *J Physiol* 84:208-218.
- [13] von Euler U.S. (1934) Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen. *Arch Exp Path Pharmacol* 175:78-84.
- [14] von Euler U.S. (1935) Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekrets. *Klinische Wochenschrift* 14:1182-1183.
- [15] von Euler U.S. (1936) On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals. *J Physiol* 88:213-234.
- [16] Bergström S., Ryhage R., Samuelsson B. and Sjövall J. (1963) Prostaglandins and Related Factors. 15. The Structures of Prostaglandin E1, F1alpha and F1beta. *J Biol Chem* 238 (11):3555-3564.
- [17] Bergstroem S., Danielsson H. and Samuelsson B. (1964) The Enzymatic Formation of Prostaglandin E2 from Arachidonic Acid Prostaglandins and Related Factors 32. *Biochim Biophys Acta* 90:207-210.
- [18] Das U.N. (2005) COX-2 inhibitors and metabolism of essential fatty acids. *Med Sci Monit* 11 (7):RA233-237.
- [19] Jackson S.K. and Parton J. (2004) Lysophospholipid acyltransferases in monocyte inflammatory responses and sepsis. *Immunobiology* 209 (1-2):31-38.
- [20] Zhou L. and Nilsson A. (2001) Sources of eicosanoid precursor fatty acid pools in tissues. *J Lipid Res* 42 (10):1521-1542.
- [21] Chilton F.H. and Murphy R.C. (1986) Remodeling of arachidonate-containing phosphoglycerides within the human neutrophil. *J Biol Chem* 261 (17):7771-7777.
- [22] Kudo I. and Murakami M. (2002) Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:3-58.
- [23] Diaz B.L. and Arm J.P. (2003) Phospholipase A(2). *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 69 (2-3):87-97.

- [24] Vane J.R., Bakhle Y.S. and Botting R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97-120.
- [25] Simmons D.L., Botting R.M. and Hla T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev* 56 (3):387-437.
- [26] Chandrasekharan N.V., Dai H., Roos K.L., Evanson N.K., Tomsik J., Elton T.S. and Simmons D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21):13926-13931.
- [27] Kis B., Snipes J.A. and Busija D.W. (2005) Acetaminophen and the COX-3 Puzzle: Sorting out Facts, Fictions and Uncertainties. *J Pharmacol Exp Ther*
- [28] Smith W.L., DeWitt D.L. and Garavito R.M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 69:145-182.
- [29] Garavito R.M., Malkowski M.G. and DeWitt D.L. (2002) The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:129-152.
- [30] Gupta K., Selinsky B.S., Kaub C.J., Katz A.K. and Loll P.J. (2004) The 2.0 Å resolution crystal structure of prostaglandin H2 synthase-1: structural insights into an unusual peroxidase. *J Mol Biol* 335 (2):503-518.
- [31] Warner T.D. and Mitchell J.A. (2004) Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic. *Faseb J* 18 (7):790-804.
- [32] Hinz B. and Brune K. (2002) Cyclooxygenase-2 - 10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300 (2):367-375.
- [33] Yamagata K., Andreasson K.I., Kaufmann W.E., Barnes C.A. and Worley P.F. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11 (2):371-386.
- [34] Kniss D.A. (1999) Cyclooxygenases in reproductive medicine and biology. *J Soc Gynecol Investig* 6 (6):285-292.
- [35] Harris R.C., McKanna J.A., Akai Y., Jacobson H.R., Dubois R.N. and Breyer M.D. (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94 (6):2504-2510.
- [36] Patrignani P., Tacconelli S., Sciulli M.G. and Capone M.L. (2005) New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res Brain Res Rev* 48 (2):352-359.
- [37] Poonam D., Vinay C.S. and Gautam P. (2005) Cyclo-oxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in experimental chronic gastric ulcer healing. *Eur J Pharmacol* 519 (3):277-284.
- [38] Jakobsson P.J., Thoren S., Morgenstern R. and Samuelsson B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (13):7220-7225.
- [39] Murakami M., Nakashima K., Kamei D., Masuda S., Ishikawa Y., Ishii T., Ohmiya Y., Watanabe K. and Kudo I. (2003) Cellular prostaglandin E2 production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 278 (39):37937-37947.
- [40] Tanioka T., Nakatani Y., Semmyo N., Murakami M. and Kudo I. (2000) Molecular identification of cytosolic prostaglandin E2 synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biol Chem* 275 (42):32775-32782.
- [41] Stichtenoth D.O., Thoren S., Bian H., Peters-Golden M., Jakobsson P.J. and Crofford L.J. (2001) Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucocorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 167 (1):469-474.
- [42] Thoren S. and Jakobsson P.J. (2000) Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* 267 (21):6428-6434.

- [43] Korotkova M., Westman M., Gheorghe K.R., af Klint E., Trollmo C., Ulfgren A.K., Klareskog L. and Jakobsson P.J. (2005) Effects of antirheumatic treatments on the prostaglandin E2 biosynthetic pathway. *Arthritis Rheum* 52 (11):3439-3447.
- [44] Helliwell R.J., Adams L.F. and Mitchell M.D. (2004) Prostaglandin synthases: recent developments and a novel hypothesis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70 (2):101-113.
- [45] Murakami M., Nakatani Y., Tanioka T. and Kudo I. (2002) Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:383-399.
- [46] Bos C.L., Richel D.J., Ritsema T., Peppelenbosch M.P. and Versteeg H.H. (2004) Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 36 (7):1187-1205.
- [47] Narumiya S., Sugimoto Y. and Ushikubi F. (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79 (4):1193-1226.
- [48] Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K. and Schäfer-Korting M., Mutschler Arzneimittelwirkungen, 2001.
- [49] Breyer R.M., Bagdassarian C.K., Myers S.A. and Breyer M.D. (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:661-690.
- [50] Nakamura K., Kaneko T., Yamashita Y., Hasegawa H., Katoh H., Ichikawa A. and Negishi M. (1999) Immunocytochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat hypothalamus. *Neurosci Lett* 260 (2):117-120.
- [51] Ushikubi F., Segi E., Sugimoto Y., Murata T., Matsuoka T., Kobayashi T., Hizaki H., Tuboi K., Katsuyama M., Ichikawa A., Tanaka T., Yoshida N. and Narumiya S. (1998) Impaired febrile response in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP3. *Nature* 395 (6699):281-284.
- [52] Urade Y. and Eguchi N. (2002) Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:375-382.
- [53] Urade Y. and Hayaishi O. (1999) Prostaglandin D2 and sleep regulation. *Biochim Biophys Acta* 1436 (3):606-615.
- [54] Eguchi N., Minami T., Shirafuji N., Kanaoka Y., Tanaka T., Nagata A., Yoshida N., Urade Y., Ito S. and Hayaishi O. (1999) Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (2):726-730.
- [55] Xue L., Gyles S.L., Wetley F.R., Gazi L., Townsend E., Hunter M.G. and Pettipher R. (2005) Prostaglandin D2 causes preferential induction of proinflammatory Th2 cytokine production through an action on chemoattractant receptor-like molecule expressed on Th2 cells. *J Immunol* 175 (10):6531-6536.
- [56] Scher J.U. and Pillinger M.H. (2005) 15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin? *Clin Immunol* 114 (2):100-109.
- [57] Watanabe K. (2002) Prostaglandin F synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:401-407.
- [58] Muratani T., Nishizawa M., Matsumura S., Mabuchi T., Abe K., Shimamoto K., Minami T. and Ito S. (2003) Functional characterization of prostaglandin F2alpha receptor in the spinal cord for tactile pain (allodynia). *J Neurochem* 86 (2):374-382.
- [59] Nakayama T. (2005) Prostacyclin synthase gene: genetic polymorphisms and prevention of some cardiovascular diseases. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 3 (2):157-164.
- [60] da Costa L.T., He T.C., Yu J., Sparks A.B., Morin P.J., Polyak K., Laken S., Vogelstein B. and Kinzler K.W. (1999) CDX2 is mutated in a colorectal cancer with normal APC/beta-catenin signaling. *Oncogene* 18 (35):5010-5014.
- [61] Hatae T., Wada M., Yokoyama C., Shimonishi M. and Tanabe T. (2001) Prostacyclin-dependent apoptosis mediated by PPAR delta. *J Biol Chem* 276 (49):46260-46267.
- [62] Lilly C.M. and Palmer L.J. (2005) The role of prostaglandin D receptor gene in asthma pathogenesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33 (3):224-226.
- [63] Dusting G.J., Moncada S. and Vane J.R. (1978) Recirculation of prostacyclin (PGI2) in the dog. *Br J Pharmacol* 64 (2):315-320.

- [64] Cho M.J. and Allen M.A. (1978) Chemical stability of prostacyclin (PGI₂) in aqueous solutions. *Prostaglandins* 15 (6):943-954.
- [65] Wang L.H. and Kulmacz R.J. (2002) Thromboxane synthase: structure and function of protein and gene. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:409-422.
- [66] Hamberg M. and Samuelsson B. (1974) Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (9):3400-3404.
- [67] Diczfalussy U., Falardeau P. and Hammarstrom S. (1977) Conversion of prostaglandin endoperoxides to C17-hydroxy acids catalyzed by human platelet thromboxane synthase. *FEBS Lett* 84 (2):271-274.
- [68] John H., Cammann K. and Schlegel W. (1998) Development and review of radioimmunoassay of 12-S-hydroxyheptadecatrienoic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 56 (2-3):53-76.
- [69] Hamberg M., Svensson J. and Samuelsson B. (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (8):2994-2998.
- [70] Needleman P., Moncada S., Bunting S., Vane J.R., Hamberg M. and Samuelsson B. (1976) Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* 261 (5561):558-560.
- [71] Kindahl H. (1977) Metabolism of thromboxane B₂ in the cynomolgus monkey. *Prostaglandins* 13 (4):619-629.
- [72] Branger J., van den Blink B., Weijer S., Gupta A., van Deventer S.J., Hack C.E., Peppelenbosch M.P. and van der Poll T. (2003) Inhibition of coagulation, fibrinolysis, and endothelial cell activation by a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor during human endotoxemia. *Blood* 101 (11):4446-4448.
- [73] Walsh M.T., Foley J.F. and Kinsella B.T. (2000) The alpha, but not the beta, isoform of the human thromboxane A₂ receptor is a target for prostacyclin-mediated desensitization. *J Biol Chem* 275 (27):20412-20423.
- [74] Ji R.R., Kohno T., Moore K.A. and Woolf C.J. (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci* 26 (12):696-705.
- [75] Zeilhofer H.U. (2005) The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62 (18):2027-2035.
- [76] Ladarola J.M. and Caudle R.M. (1997) Good pain, bad pain. *Science* 278 (5336):239-240.
- [77] Zeilhofer H.U. (2005) Synaptic modulation in pain pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 154:73-100.
- [78] Hunt S.P. and Mantyh P.W. (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2 (2):83-91.
- [79] Salter M.W. (2005) Cellular signalling pathways of spinal pain neuroplasticity as targets for analgesic development. *Curr Top Med Chem* 5 (6):557-567.
- [80] Woolf C.J. and Salter M.W. (2000) Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288 (5472):1765-1769.
- [81] Woolf C.J. and Max M.B. (2001) Mechanism-based pain diagnosis: issues for analgesic drug development. *Anesthesiology* 95 (1):241-249.
- [82] Malmberg A.B. and Yaksh T.L. (1992) Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 263 (1):136-146.
- [83] Kaufmann W.E., Andreasson K.I., Isakson P.C. and Worley P.F. (1997) Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins* 54 (3):601-624.
- [84] Vanegas H. and Schaible H.G. (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64 (4):327-363.
- [85] Beiche F., Scheuerer S., Brune K., Geisslinger G. and Goppelt-Strube M. (1996) Up-regulation of cyclooxygenase-2 mRNA in the rat spinal cord following peripheral inflammation. *FEBS Lett* 390 (2):165-169.

- [86] Tegeder I., Niederberger E., Vetter G., Brautigam L. and Geisslinger G. (2001) Effects of selective COX-1 and -2 inhibition on formalin-evoked nociceptive behaviour and prostaglandin E(2) release in the spinal cord. *J Neurochem* 79 (4):777-786.
- [87] Thomson J.J. (1899) On the Masses of the Ions in Gases at Low Pressures. *Phil Mag* 48 (295):547-567.
- [88] Willoughby R., Sheehan E. and Mitrovich S., A global view of LC/MS, Global View Publishing, Pittsburgh, Pennsylvania, 1998.
- [89] Dempster A.J. (1918) A new Method of Positive Ray Analysis. *Phys Rev* 11 (4):316-325.
- [90] Dole M., Mack L.L., Hines R.L., Mobley R.C., Ferguson L.D. and Alice M.B. (1968) Molecular Beams of Macroions. *J Chem Phys* 49 (5):2240.
- [91] Mack L.L., Kralik P., Rheude A. and Dole M. (1970) Molecular Beams of Macroions. II. *J Chem Phys* 52 (10):4977-4986.
- [92] Chapman S. (1937) Carrier Mobility Spectra of Spray Electrified Liquids. *Physical Review* 52 (3):184-190.
- [93] Yamashita M. and Fenn J.B. (1984) Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem* 88 (20):4451-4459.
- [94] Whitehouse C.M., Dreyer R.N., Yamashita M. and Fenn J.B. (1985) Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal Chem* 57 (3):675-679.
- [95] Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. and Whitehouse C.M. (1989) Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (4926):64-71.
- [96] Taylor G. (1964) Disintegration of water drops in an electric field. *Proc Roy Soc London Ser A* 280 (1382):383-397.
- [97] Bruins A.P. (1998) Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J Chromatogr A* 794 (1-2):345-357.
- [98] Iribarne J.V. and Thomson B.A. (1976) On the evaporation of small ions from charged droplets. *J Chem Phys* 64 (6):2287-2294.
- [99] Thomson B.A. and Iribarne J.V. (1979) Field induced ion evaporation from liquid surfaces at atmospheric pressure. *J Chem Phys* 71 (11):4451-4463.
- [100] Niessen W.M. (1998) Advances in instrumentation in liquid chromatography-mass spectrometry and related liquid-introduction techniques. *J Chromatogr A* 794 (1-2):407-435.
- [101] Niessen W.M. (1999) State-of-the-art in liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 856 (1-2):179-197.
- [102] Wolnik H. (1999) Ion optics in mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34 (10):991-1006.
- [103] Paul W. and Steinwedel H.Z. (1953) Ein neues Massenspektrometer ohne Magnetfeld. *Naturforsch* 8A:448-450.
- [104] Blaum K., Geppert C., Müller P., Nörtershäuser W., Otten E.W., Schmitt A., Trautmann N., Wendt K. and Bushaw B.A. (1998) Properties and performance of a quadrupole mass filter used for resonance ionization mass spectrometry. *Int J Mass Spectrom* 181 (1-3):67-87.
- [105] Blaum K., Geppert C., Müller P., Nörtershäuser W., Wendt K. and Bushaw B.A. (2000) Peak shape for a quadrupole mass spectrometer: comparison of computer simulation and experiment *Int J Mass Spectrom* 200 (1-3):81-89.
- [106] Yost R.A. and Enke C.G. (1978) Selected ion fragmentation with a tandem quadrupole mass spectrometer. *J Am Chem Soc* 100 (7):2274-2275.
- [107] FDA, Guidance for Industry - Bioanalytical Method Validation, 2001.
- [108] Causon R. (1997) Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 689 (1):175-180.
- [109] Rogatsky E. and Stein D. (2005) Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development. *J Am Soc Mass Spectrom* 16 (11):1757-1759.

- [110] Ito S. and Tsukada K. (2002) Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J Chromatogr A* 943 (1):39-46.
- [111] Matuszewski B.K., Constanzer M.L. and Chavez-Eng C.M. (1998) Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Anal Chem* 70 (5):882-889.
- [112] Choi B.K., Hercules D.M. and Gusev A.I. (2001) Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. *J Chromatogr A* 907 (1-2):337-342.
- [113] Choi B.K., Hercules D.M. and Gusev A.I. (2001) LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices. *Fresenius J Anal Chem* 369 (3-4):370-377.
- [114] Hsieh Y., Chintala M., Mei H., Agans J., Brisson J.M., Ng K. and Korfmacher W.A. (2001) Quantitative screening and matrix effect studies of drug discovery compounds in monkey plasma using fast-gradient liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 15 (24):2481-2487.
- [115] Pascoe R., Foley J.P. and Gusev A.I. (2001) Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography. *Anal Chem* 73 (24):6014-6023.
- [116] Avery M.J. (2003) Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17 (3):197-201.
- [117] Kloepper A., Quintana J.B. and Reemtsma T. (2005) Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples. *J Chromatogr A* 1067 (1-2):153-160.
- [118] Stuber M. and Reemtsma T. (2004) Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS. *Anal Bioanal Chem* 378 (4):910-916.
- [119] Zimmer D., Pickard V., Czembor W. and Muller C. (1999) Comparison of turbulent-flow chromatography with automated solid-phase extraction in 96-well plates and liquid-liquid extraction used as plasma sample preparation techniques for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 854 (1-2):23-35.
- [120] Vetter G., Geisslinger G. and Tegeder I. (2001) Release of glutamate, nitric oxide and prostaglandin E2 and metabolic activity in the spinal cord of rats following peripheral nociceptive stimulation. *Pain* 92 (1-2):213-218.
- [121] Shibata T., Kondo M., Osawa T., Shibata N., Kobayashi M. and Uchida K. (2002) 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes. *J Biol Chem* 277 (12):10459-10466.
- [122] Brautigam L., Vetter G., Tegeder I., Heinkele G. and Geisslinger G. (2001) Determination of celecoxib in human plasma and rat microdialysis samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 761 (2):203-212.
- [123] Dixon R.A., Diehl R.E., Opas E., Rands E., Vickers P.J., Evans J.F., Gillard J.W. and Miller D.K. (1990) Requirement of a 5-lipoxygenase-activating protein for leukotriene synthesis. *Nature* 343 (6255):282-284.
- [124] Gupta N., Nicholson D.W. and Ford-Hutchinson A.W. (1997) Pharmacological cross-reactivity between 5-lipoxygenase-activating protein, 5-lipoxygenase, and leukotriene C4 synthase. *Can J Physiol Pharmacol* 75 (10-11):1212-1219.
- [125] Mancini J.A., Blood K., Guay J., Gordon R., Claveau D., Chan C.C. and Riendeau D. (2001) Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin e synthase during lipopolysaccharide-induced pyrexia and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 276 (6):4469-4475.
- [126] Mancini J.A., Waterman H. and Riendeau D. (1998) Cellular oxygenation of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by 5-lipoxygenase is stimulated by 5-lipoxygenase-activating protein. *J Biol Chem* 273 (49):32842-32847.

- [127] Fu J.Y., Masferrer J.L., Seibert K., Raz A. and Needleman P. (1990) The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265 (28):16737-16740.
- [128] Xie W.L., Chipman J.G., Robertson D.L., Erikson R.L. and Simmons D.L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (7):2692-2696.
- [129] Patrignani P., Panara M.R., Greco A., Fusco O., Natoli C., Iacobelli S., Cipollone F., Ganci A., Creminon C., Maclouf J. and et al. (1994) Biochemical and pharmacological characterization of the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *J Pharmacol Exp Ther* 271 (3):1705-1712.
- [130] Schweer H., Kammer J. and Seyberth H.W. (1985) Simultaneous determination of prostanoids in plasma by gas chromatography-negative-ion chemical-ionization mass spectrometry. *J Chromatogr* 338 (2):273-280.
- [131] Papafili A., Hill M.R., Brull D.J., McAnulty R.J., Marshall R.P., Humphries S.E. and Laurent G.J. (2002) Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (10):1631-1636.
- [132] Cipollone F., Toniato E., Martinotti S., Fazia M., Iezzi A., Cuccurullo C., Pini B., Ursi S., Vitullo G., Averna M., Arca M., Montali A., Campagna F., Uchino S., Spigonardo F., Taddei S., Viridis A., Ciabattini G., Notarbartolo A., Cuccurullo F. and Mezzetti A. (2004) A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *Jama* 291 (18):2221-2228.
- [133] Szczeklik W., Sanak M. and Szczeklik A. (2004) Functional effects and gender association of COX-2 gene polymorphism G-765C in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 114 (2):248-253.
- [134] Suske G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238 (2):291-300.
- [135] FitzGerald G.A. and Patrono C. (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 345 (6):433-442.

9. Abkürzungsverzeichnis

[M – H] ⁻	Molekül-Ion – Wasserstoffatom
[M + H] ⁺	Molekül-Ion + Wasserstoffatom
Å	10 ⁻¹⁰ m
AA	Arachidonsäure
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> künstlicher Liquor
amu	<i>atom mass unit</i> atomare Masseneinheit
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure-Rezeptor
AP-1	<i>activator-protein-1</i> Aktivator-Protein-1
APCI	<i>atmospheric pressure chemical ionisation</i> chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck
API	<i>atmospheric pressure ionisation</i> Ionisierung unter Atmosphärendruck
AUX	<i>auxiliary gas (nur am API 3000)</i> Hilfsgas für den Heizfön
C ₁₈	Octadecyl- (C ₁₈ H ₃₉)
C ₈	Octyl- (C ₈ H ₁₇)
CAD	<i>collision activated dissociation gas (API 3000 und API 4000)</i> Gas für die Kollisions-aktivierte Dissoziation
cAMP	Cycloadenosinmonophosphat
CE	<i>capillary electrophoresis</i> Kapillarelektrophorese
CE	<i>collision energy (V)</i> Kollisionsenergie
CEM	<i>channel electron multiplier</i> Elektronenvervielfacher
CI	<i>chemical ionisation</i> chemische Ionisierung
CID	<i>collision induced dissociation</i> Kollisions-induzierte Dissoziation
COX	Cyclooxygenasen
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
cPGES	cytosolische Prostaglandin E-Synthase
cPLA ₂	cytosolische Phospholipase
cps	<i>counts per second</i> Signalintensität pro Sekunde
CRTH2	<i>chemoattractant receptorhomologous molecule expressed on T Helper type 2</i>
CUR	<i>curtain gas (API 3000 und API 4000)</i> Gasvorhang
CXP	<i>cell exit potential (V)</i> Ausgangspotential der Kollisionszelle
CYP450	Cytochrom P-450

DGLA	Dihomo- γ -linolensäure
DP	<i>declustering potential (V)</i>
DP	PGD ₂ -Rezeptoren
EET	Epoxyeicosatriensäuren
EI	<i>electron impact</i> Elektronenstoßionisierung
EIA	<i>enzyme immunoassay</i> Enzym-Immunoassay
ELISA	<i>enzyme-linked immunoassay</i> Enzym-gekoppelter Immunoassay
EP	<i>entrance potential (V)</i> Eingangspotential
EP ₁₋₄	PGE ₂ -Rezeptoren
EPA	Eicosapentaensäure
EPSP	extrinsisches postsynaptisches Signal
ESI	<i>electrospray ionisation</i> Elektrospray Ionisierung
ESPI	<i>electrospray ion source</i> Elektrospray-Ionen-Quelle
eV	Elektronenvolt
FAAH	<i>fatty acid amide hydrolase</i> Fettsäure-Amid-Hydrolase
FA	<i>formic acid</i> Ameisensäure
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i> Amerikanische Lebensmittel- und Arzneimittelbehörde
FP	<i>focusing potential (V)</i> Fokussierungs-Potential
FP	PGF _{2α} -Rezeptoren
GC	<i>gas chromatography</i> Gas Chromatographie
GS1	<i>gas supply 1 (nur am API 4000)</i> entspricht dem Zerstäubergas (<i>nebulizer gas</i> , NEB) am API 3000
GS2	<i>gas supply 2 (nur am API 4000)</i> entspricht dem Hilfgas (<i>ausiliary gas</i> , AUX) am API 3000
G _s , G _q , G _i	G-Proteine
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
H-PGDS	Hämatopoietische-PGD-Synthase
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
HX	Hepoxiline
IL-1 β	Interleukin-1 β
i.p.	intraperitoneal
IP	Isoprostane
IP	PGI ₂ -Rezeptoren
iPLA ₂	inhibitorische Phospholipase A ₂
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Signal

IS	<i>ionspray voltage</i> Spannung an der Elektrospray-Nadel
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography tandem mass spectrometry</i> Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie
LX	Lipoxine
LO	Lipoxygenase
LLOQ	<i>lower limit of quantification</i> Quantifizierungsgrenze
L-PGDS	Lipokalin-PGD-Synthase
LPS	Lipopolysaccharid (Escherichia coli Serotyp, Typ 026:B6)
LT	Leukotriene
M	Molekulargewicht
mGLU	metabotrope Glutamatrezeptoren
μ	Mittelwert
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein kinase</i> Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MALDI	<i>matrix assisted laser desorption/ ionisation</i> Matrix unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MeOH	Methanol
mPGES-1	Membran-gebundene Prostaglandin E-Synthase 1
mPGES-2	Membran-gebundene Prostaglandin E-Synthase 2
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i> Multiple Reaktionen Überwachung
MS	<i>mass spectrometry</i> Massenspektrometrie
NEB	<i>nebulizer gas (nur am API 3000)</i> Zerstäuber Gas
NF- κ B	<i>nuclear-factor-κB</i> Nukleärer Faktor- κ B
NK-1	Neurokinin-1-Rezeptor
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
NSAR	Nicht-Steroid Antirheumatika
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i> siehe NSAR
PL	Phospholipasen
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PG	Prostaglandine
PGDS	PGD-Synthase
PGFS	PGF-Synthase
PGFS-1	PGF-Synthase-1
PGFS-2	PGF-Synthase-2
PGIS	PGI-Synthase
PPAR _{α, δ, γ}	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i> Peroxisomen-Proliferations-aktivierter Rezeptor

Q ₀ , Q ₁ , Q ₂ , Q ₃	Quadrupole
QC	Qualitätskontrollen
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i> mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RIA	<i>radio immunoassay</i> Radio-Immunoassay
RP	<i>reversed phase</i> Umkehrphase
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
SD	Standardabweichung
rpm	<i>rounds per minute</i> Umdrehungen pro Minute
RSD	relative Standardabweichung
Sp1	<i>stimulatory protein-1</i> Stimulationsprotein-1
SPE	<i>solid phase extraction</i> Festphasenextraktion
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i> Signalübermittler und Transkriptionsaktivator
T	Temperatur des Heizgases (API 3000 und API 4000)
TNF _α	Tumornekrose-Faktor _α
TP	Thromboxan-A ₂ -Rezeptor
TP _{α, β}	Splicevarianten des Thromboxan-A ₂ -Rezeptors
TXAS	Thromboxan-A-Synthase
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
ZNS	Zentralnervensystem

10. Veröffentlichungen

10.1 Veröffentlichungen aus der vorliegenden Arbeit

1. **R. Schmidt**, O. Coste, G. Geisslinger
LC-MS/MS-Analysis of prostaglandin E₂ and D₂ in microdialysis samples of rats. *J. Chromatogr. B* 2005; 826(1-2):188-97.
2. **R. Schmidt**, C. Skarke, C. Angioni, G. Geisslinger
LC-MS/MS-Analysis of prostaglandins and thromboxane B₂ in human plasma. *J. Lipid Res.* (eingereicht)

10.2 Sonstige Veröffentlichungen

3. J. Lötsch, **R. Schmidt**, G. Vetter, H. Schmidt, C. Skarke, E. Niederberger, G. Geisslinger, I. Tegeder
The influence of inhibition of probenecid sensitive transporters on the central nervous system (CNS) uptake and the antinociceptive activity of morphine-6-glucuronide in rats. *Neurosci. Lett.* 2002;329(2):145-8.
4. J. Lötsch, **R. Schmidt**, G. Vetter, H. Schmidt, E. Niederberger, G. Geisslinger, I. Tegeder
Increased CNS uptake and enhanced antinociception of morphine-6-glucuronide in rats after inhibition of P-glycoprotein. *J. Neurochem.* 2002;83(2):241-248.
5. I. Tegeder, E. Niederberger, **R. Schmidt**, S. Kunz, H. Gühring, O. Ritzeler, M. Michaelis, G. Geisslinger
Specific Inhibition of I-kappaB kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J. Neurosci.* 2004;24(7):1637-1645.
6. T.J. Maier, K. Schilling, **R. Schmidt**, G. Geisslinger, S. Grösch
COX-2 (cyclooxygenase-2) dependent and independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* 2004;67(8):1469-1478.
7. U.R. Michaelis, J.R. Falck, **R. Schmidt**, R. Busse, I. Fleming
Cytochrome P450-2C9-derived epoxyeicosatrienoic acids induce the expression of cyclooxygenase-2 in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005; 25(2):321-326.
8. O. Jung O, R.P. Brandes, I.H. Kim, F. Schweda, **R. Schmidt**, B.D. Hammock, R. Busse, I. Fleming
Soluble epoxide hydrolase is a main effector of angiotensin II-induced hypertension. *Hypertension* 2005;45(4):759-765.

9. H. Kämpfer, **R. Schmidt**, G. Geisslinger, J. Pfeilschifter, S. Frank
Wound inflammation in diabetic ob/ob mice: functional coupling of prostaglandin biosynthesis to cyclooxygenase-1 activity in diabetes-impaired wound healing. *Diabetes* 2005;54(5):1543-51.

10. T.J. Maier, A. Janssen, **R. Schmidt**, G. Geisslinger, S. Grösch
Targeting the beta-catenin/APC pathway: a novel mechanism to explain the Cyclooxygenase-2-independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *FASEB J.* 2005;19(10):1353-1355.

11. B.G. Oertel, **R. Schmidt**, A. Schneider, G. Geisslinger, J. Lötsch
The mu-opioid receptor gene polymorphism 118A>G protects against alfentanil induced respiratory depression in homozygous carriers. *Pharmacogenet. Genomics* 2006 (im Druck)

12. **R. Schmidt**, D.H. Bremerich, G. Geisslinger
High sensitive determination of sufentanil in human plasma of parturients and neonates following patient-controlled epidural analgesia (PCEA). *J. Chromatogr. B* 2006; 836(1-2):98-107.

13. C. Brenneis, T.J. Maier, **R. Schmidt**, A. Hofacker, L. Zulauf, K. Scholich, G. Geisslinger
SC-560 is a potent inhibitor of tumor necrosis factor α induced prostaglandine E2 synthesis in neurons independent from cyclooxygenase-1. *FASEB J.* 2006 (im Druck)

14. C. Daniel, N. Sartory, N. Zahn, **R. Schmidt**, H.H. Radeke, G. Geisslinger, J. Stein
Successful treatment of Th1- and Th2-mediated colitis in mice by the sphingosine-1-phosphate analogue FTY720. (eingereicht)

15. H. Schmidt, **R. Schmidt**, G. Geisslinger
LC-MS/MS-analysis of sphingosine-1-phosphate and related compounds in plasma samples. *J. Lipid Res.* (eingereicht)

16. S. Schiffmann, T.J. Maier, A. Janssen, **R. Schmidt**, H. Corban-Wilhelm, C. Angioni, G. Geisslinger, S. Grösch
Intracellular accumulation of celecoxib: essential basis for its strong COX-2-independent antiproliferative effect? *J. Natl. Cancer Inst.* (eingereicht)

11. Förderung und Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Gerd Geißlinger für die Bereitstellung des Themas sowie die Möglichkeit mit modernen Massenspektrometern arbeiten zu können. Zudem möchte ich ihm für seine Geduld und sein Vertrauen danken.

Die vorliegende Arbeit wurde von Januar 2002 bis März 2006 am Institut für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität im Rahmen des Europäischen Graduiertenkollegs „Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine” (DFG GRK 757/1) angefertigt.

Die Mikrodialysestudie wurde von Dr. Ovidiu Coste, die mPGES-1-Inhibitor-Experimente von Ivonne Wobst und die COX-2-Studie von Dr. Carsten Skarke durchgeführt.

Dr. Carsten Skarke und Dr. Achim Schmidto danke ich für die zahlreichen Blutentnahmen und natürlich den Blutspendern Astrid Janssen, Ivonne Wobst, Carlo Angioni, Philipp Kahler, Dr. Thorsten Maier und Christine Möser.

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Ronald Schmidt
Meisenweg 4
61130 Nidderau

geboren am 02. Mai 1975 in Arad / Rumänien

Schulbildung

1981 – 1984	Joseph von Eichendorff in Hanau (Grundschule)
1984 – 1986	Lindenaus Schule in Hanau (Förderstufe)
1986 – 1994	Karl-Rehbein-Schule in Hanau (Gymnasium)

Wehrdienst

1994 – 1995	Grundwehrdienst im Standortsanitätszentrum Rennerod
-------------	---

Ausbildung

1995 – 2000	Studium der Pharmazie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main
2001	Approbation als Apotheker
2002 – 2006	Naturwissenschaftliche Promotion im Rahmen des internationalen DFG-Graduiertenkollegs „Roles of Eicosanoids in Biology and Medicine“ (DFG GRK 757/1) am Institut für Klinische Pharmakologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Geißlinger.

Praktika

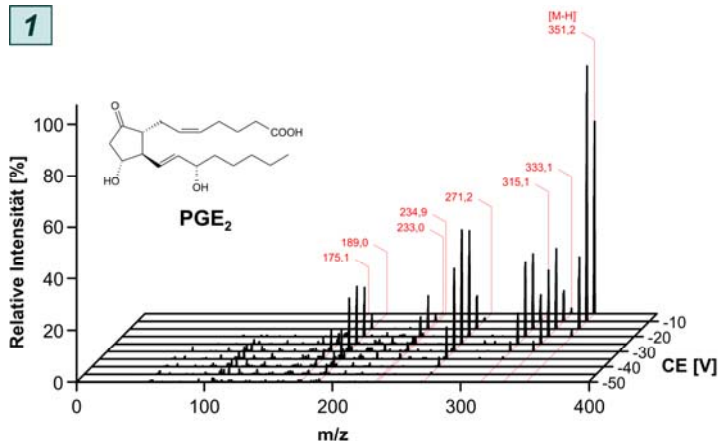
1996	Famulatur in der Sonnen-Apotheke in Nidderau (4 Wochen) Leiter: Herr T. Philippi
1996	Famulatur in der Apotheke des Stadtkrankenhauses Hanau (4 Wochen) Leiter: Frau Dr. V. Schneider
2000 – 2001	Praktische Ausbildung in der Sonnen-Apotheke in Nidderau (6 Monate) Leiter: Herr H. Dörr
2001	Praktische Ausbildung in der Apotheke des Klinikums Stadt Hanau (6 Monate) Leiter: Frau Dr. V. Schneider

13. Anhang I – Massenspektren am API 3000

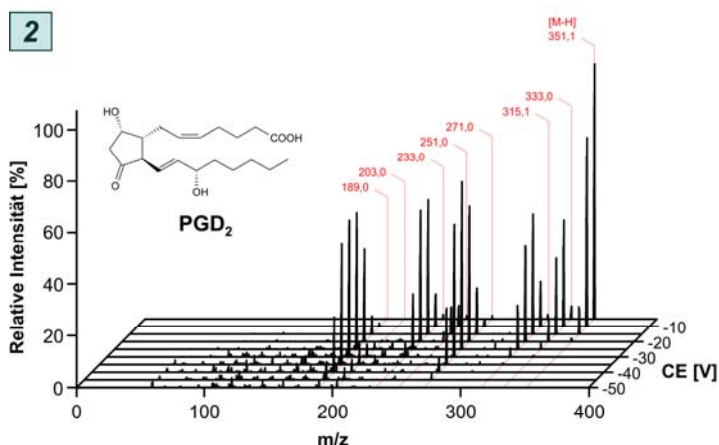
Nr. Eicosanoid	Konzentration	Nr. Eicosanoid	Konzentration
1 PGE ₂ (15S-PGE ₂)	1.000 ng/ml	21 [² H ₄]-6-keto-PGF _{1α}	5.000 ng/ml
2 PGD ₂ (15S-PGD ₂)	1.000 ng/ml	22 [² H ₄]-PGF _{2α}	2.000 ng/ml
3 6-keto-PGF _{1α}	10.000 ng/ml	23 [² H ₄]-TXB ₂	1.000 ng/ml
4 PGF _{2α}	5.000 ng/ml	24 [² H ₄]-11-dehydro-TXB ₂	1.000 ng/ml
5 PGG ₂	5.000 ng/ml	25 [² H ₄]-15d-PGJ ₂	500 ng/ml
6 PGH ₂	5.000 ng/ml	26 [² H ₄]-PGA ₂	1.000 ng/ml
7 PGA ₂	1.000 ng/ml	27 [² H ₄]-PGB ₂	1.000 ng/ml
8 PGB ₂	1.000 ng/ml	28 12-HHT	1.000 ng/ml
9 Lipoxin A ₄	1.000 ng/ml	29 15R-PGE ₂	2.000 ng/ml
10 TXB ₂	1.000 ng/ml	30 15R-PGD ₂	2.000 ng/ml
11 11-dehydro-TXB ₂	1.000 ng/ml	31 5-trans-PGE ₂	2.000 ng/ml
12 PGJ ₂	5.000 ng/ml	32 5-trans-PGD ₂	2.000 ng/ml
13 Δ ¹² -PGJ ₂	1.000 ng/ml	33 8-iso-PGE ₂	2.000 ng/ml
14 Δ ¹² -PGD ₂	1.000 ng/ml	34 11β-PGE ₂	2.000 ng/ml
15 15d-PGJ ₂	500 ng/ml		
16 15d-PGD ₂	500 ng/ml		
17 13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂	1.000 ng/ml		
18 13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂	1.000 ng/ml		
19 [² H ₄]-PGE ₂	1.000 ng/ml		
20 [² H ₄]-PGD ₂	1.000 ng/ml		

Bedingungen

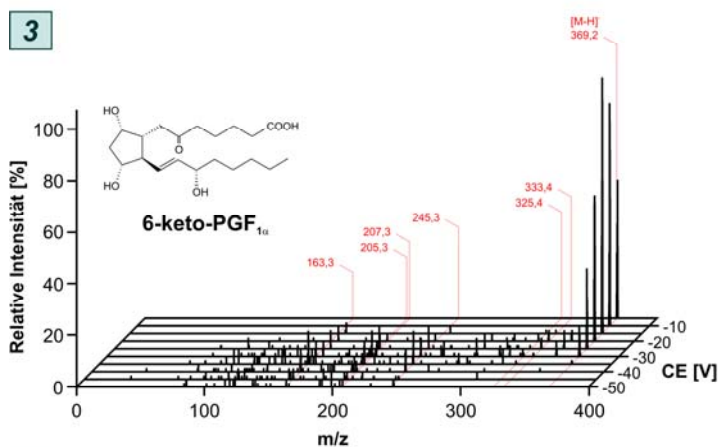
Jede Substanz wurde auf die angegebene Konzentration mit Methanol verdünnt und die Lösung nach dem automatischen Tuning der Analyst-Software mit einer Geschwindigkeit von 20 µl/min in das API 3000 infundiert und ein Produkt-Ionen-Scan durchgeführt. Als Ausgangsmasse für den Produkt-Ionen-Scan diente der Software-optimierte [M-H]⁺-Peak der entsprechenden Substanz. DP und FP wurde auf die Software-optimierten Spannungen der entsprechenden Substanz eingestellt. EP betrug in allen Scans -10 V und CXP -15 V. Innerhalb einer Sekunde wurde der Bereich von 20 amu bis [M-H]⁺ + 10 amu abgescannt und 20 dieser Scans aufsummiert. Die Kollisionsenergie, CE, wurde von -5 V bis -50 V im Abstand von 5 V variiert. Die erhaltenen 10 Produkt-Ionen-Scans (CE 5 V - 50 V, Abstand 5V) wurden in Excel auf den höchsten Peak der 10 Scans normalisiert, und über SigmaPlot und CorelDraw zu einem 3D-Diagramm zusammengefügt. Die Tabellen sind die Resultate der Tuning-Automatik der Analyst-Software. PGG₂ stand für die 3D-Spektren leider nicht mehr zur Verfügung, so dass für PGG₂ nur das normale Spektrum während der automatischen Optimierung angegeben wurde. Sonstige Einstellungen: CUR 7 (0,95 l/min), NEB 5 (0,82 l/min), CAD 4 psi, IS -4500 V und T 0 °C.



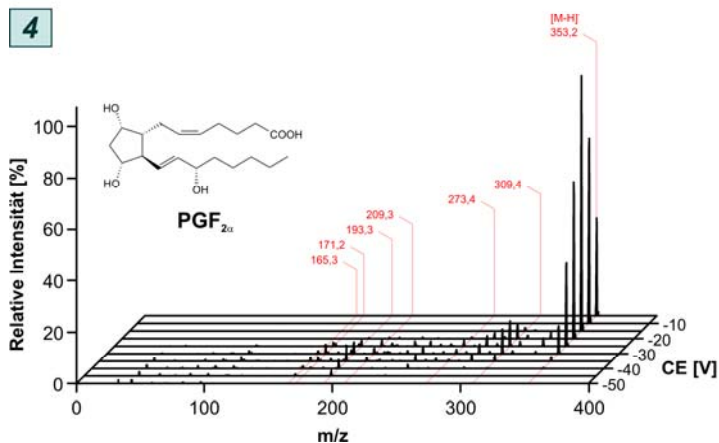
[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 175,1	-45	-185	-28	-3
351,2	→ 189,0	-45	-185	-25	-9
351,2	→ 233,0	-45	-185	-18	-5
351,2	→ 234,9	-45	-185	-28	-5
351,2	→ 271,2	-45	-185	-24	-2
351,2	→ 315,1	-45	-185	-17	-1
351,2	→ 333,1	-45	-185	-16	-5



[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,3	→ 189,1	-51	-170	-26	-11
351,3	→ 203,0	-51	-170	-34	-15
351,3	→ 233,0	-51	-170	-18	-7
351,3	→ 251,0	-51	-170	-14	-7
351,3	→ 271,2	-51	-170	-24	-7
351,3	→ 315,2	-51	-170	-18	-3
351,3	→ 333,2	-51	-170	-12	-9



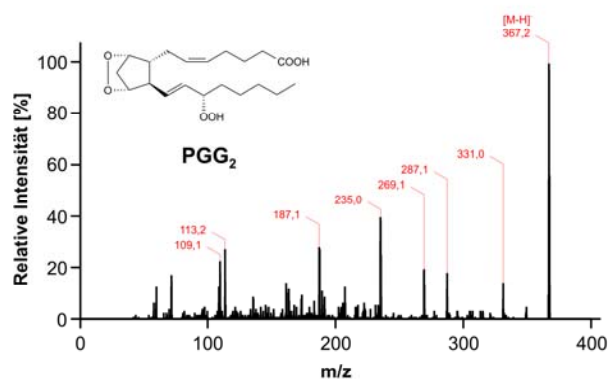
[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
369,2	→ 163,3	-71	-330	-34	-23
369,2	→ 205,3	-71	-330	-32	-7
369,2	→ 207,3	-71	-330	-30	-7
369,2	→ 245,3	-71	-330	-30	-7
369,2	→ 325,4	-71	-330	-22	-11
369,2	→ 333,4	-71	-330	-26	-5



[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
353,2	→ 165,3	-51	-310	-36	-3
353,2	→ 171,2	-51	-310	-32	-13
353,2	→ 193,3	-51	-310	-34	-3
353,2	→ 209,3	-51	-310	-30	-17
353,2	→ 273,4	-51	-310	-28	-5
353,2	→ 309,4	-51	-310	-28	-7

Quantifier Qualifier Verunreinigung

5

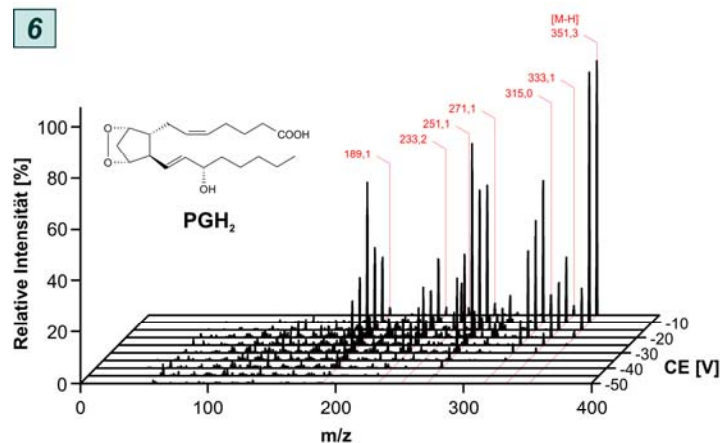
**PGG₂**C20H32O6

Molekularmasse 368,5 amu

Monoisotopische Masse 368,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
367,2	→ 109,1	-56	-190	-24	-7
367,2	→ 113,2	-56	-190	-22	-7
367,2	→ 187,1	-56	-190	-16	-1
367,2	→ 235,0	-56	-190	-14	-5
367,2	→ 269,1	-56	-190	-14	-3
367,2	→ 287,1	-56	-190	-14	-7
367,2	→ 333,1	-56	-190	-12	-9

6

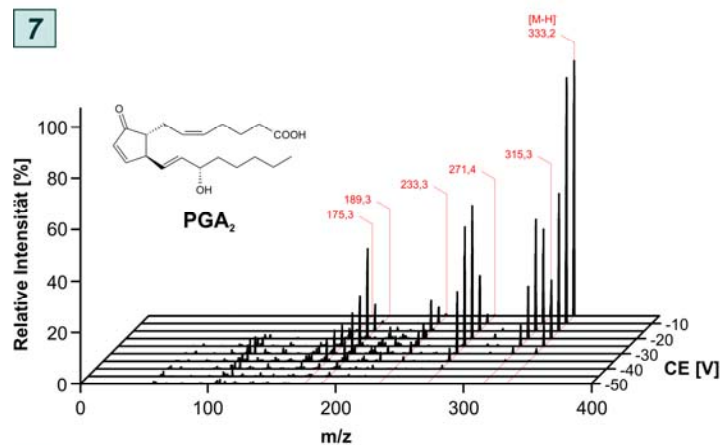
**PGH₂**C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,3	→ 189,1	-26	-260	-14	-15
351,3	→ 233,2	-26	-260	-12	-5
351,3	→ 251,1	-26	-260	-10	-1
351,3	→ 271,1	-26	-260	-16	-13
351,3	→ 315,0	-26	-260	-12	-17
351,3	→ 333,1	-26	-260	-12	-11

7

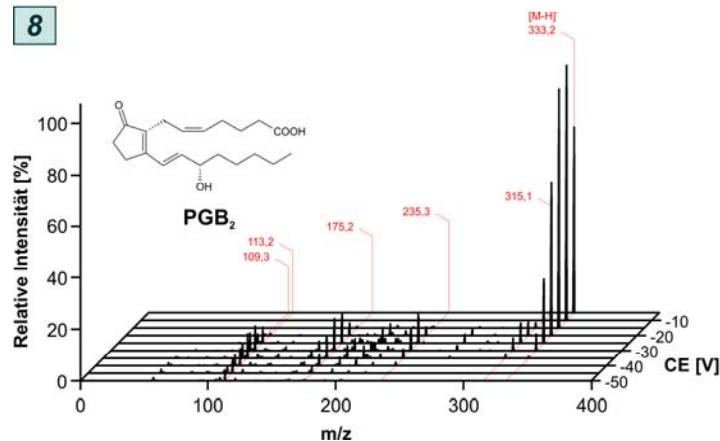
**PGA₂**C20H30O4

Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
333,2	→ 175,3	-46	-280	-26	-1
333,2	→ 189,3	-46	-280	-22	-13
333,2	→ 233,3	-46	-280	-28	-5
333,2	→ 271,4	-46	-280	-18	-1
333,2	→ 315,3	-46	-280	-16	-19

8

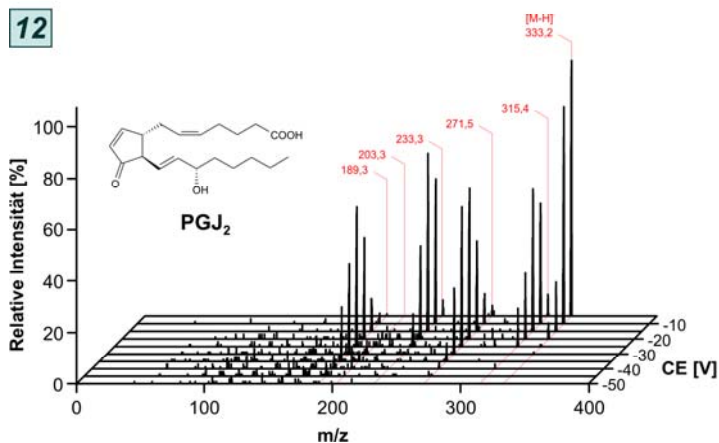
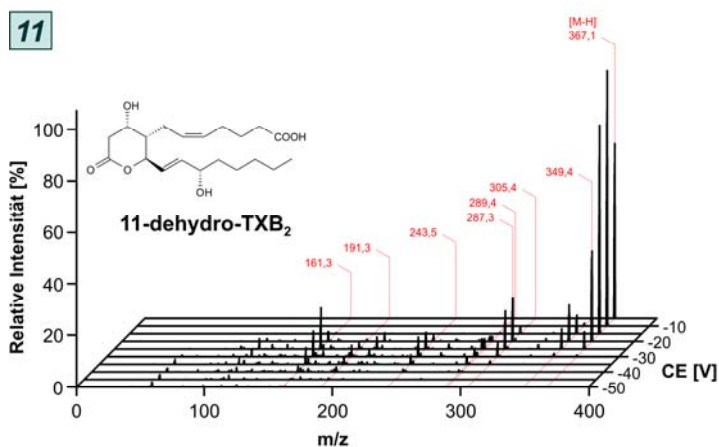
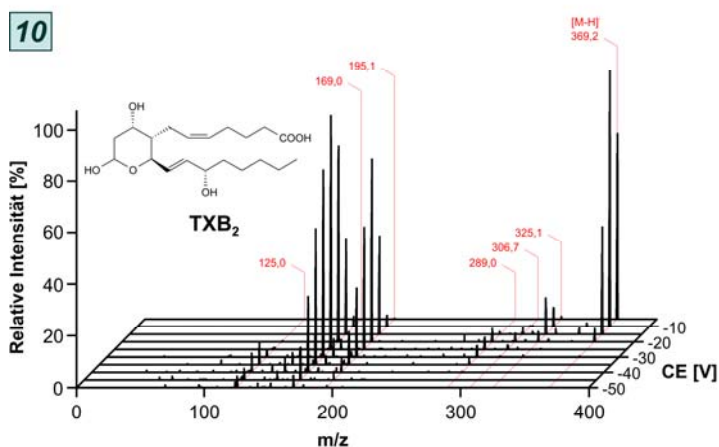
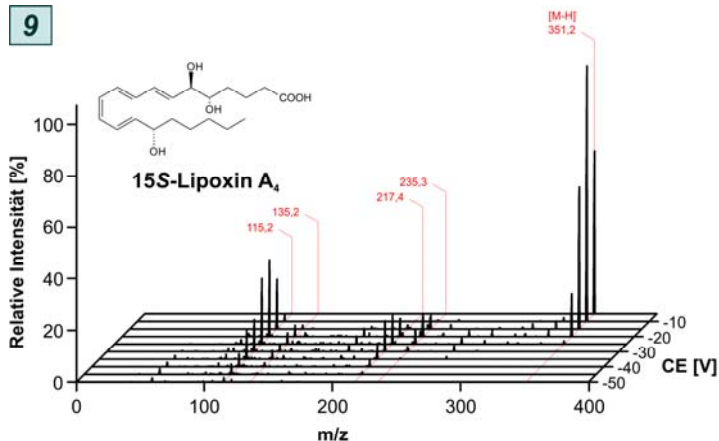
**PGB₂**C20H30O4

Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

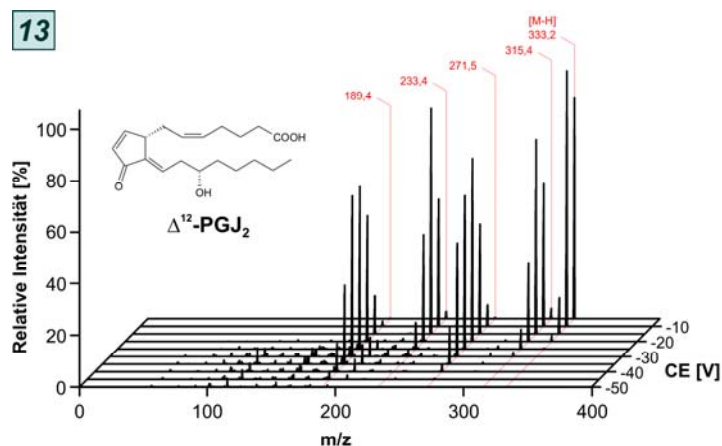
[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
333,2	→ 109,3	-56	-310	-30	-7
333,2	→ 113,2	-56	-310	-34	-7
333,2	→ 175,2	-56	-310	-28	-13
333,2	→ 235,3	-56	-310	-26	-11
333,2	→ 315,1	-56	-310	-22	-9

■ Quantifier
 ■ Qualifier
 ■ Verunreinigung



Quantifier Qualifier Verunreinigung

13

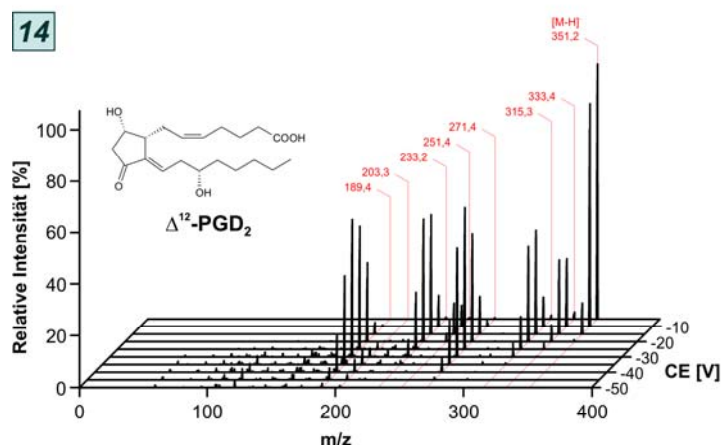

 $\Delta^{12}\text{-PGJ}_2$
 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$

Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
333,2	→ 189,4	-21	-230	-24	-15
333,2	→ 233,4	-21	-230	-14	-19
333,2	→ 271,5	-21	-230	-22	-17
333,2	→ 315,4	-21	-230	-14	-19

14

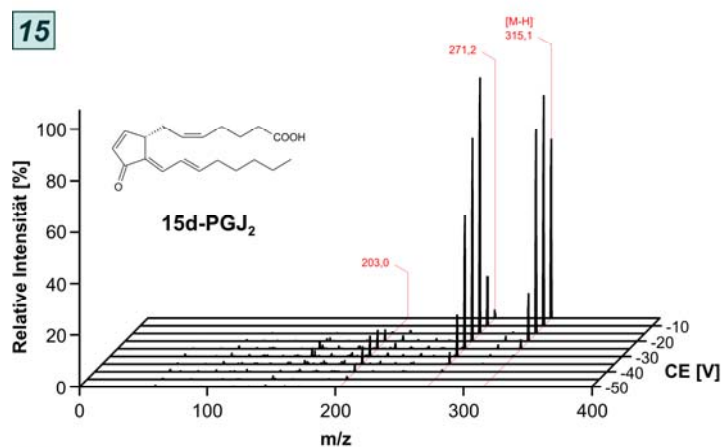

 $\Delta^{12}\text{-PGD}_2$
 $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 189,4	-51	-300	-28	-1
351,2	→ 203,3	-51	-300	-38	-17
351,2	→ 233,2	-51	-300	-16	-13
351,2	→ 251,4	-51	-300	-16	-13
351,2	→ 271,4	-51	-300	-24	-9
351,2	→ 315,3	-51	-300	-18	-5
351,2	→ 333,4	-51	-300	-12	-5

15

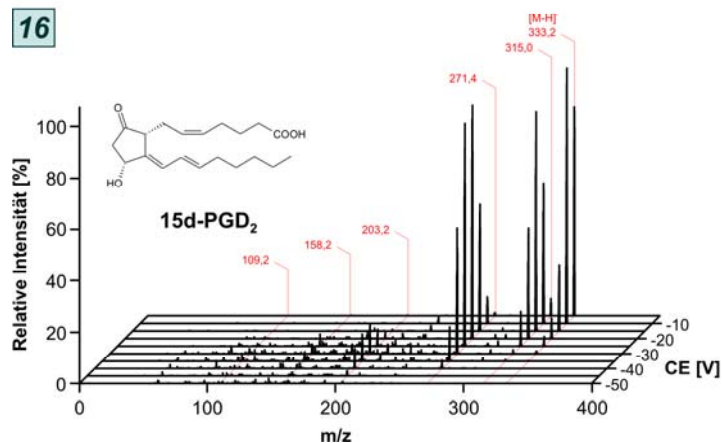

15-deoxy- $\Delta^{12,14}\text{-PGJ}_2$, 15d-PGJ₂
 $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_3$

Molekularmasse 316,4 amu

Monoisotopische Masse 316,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
315,1	→ 203,1	-76	-150	-28	-11
315,1	→ 271,2	-76	-150	-22	-9

16


15-deoxy- $\Delta^{12,14}\text{-PGD}_2$, 15d-PGD₂
 $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$

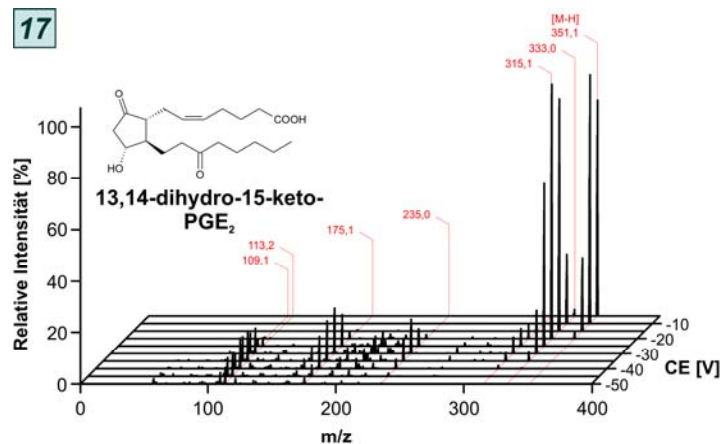
Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
333,2	→ 109,2	-31	-280	-32	-11
333,2	→ 158,2	-31	-280	-26	-9
333,2	→ 203,2	-31	-280	-32	-15
333,2	→ 271,4	-31	-280	-16	-13
333,2	→ 315,0	-31	-280	-14	-21

Quantifier Qualifier Verunreinigung

17



13,14-dihydro-15-keto-PGE₂

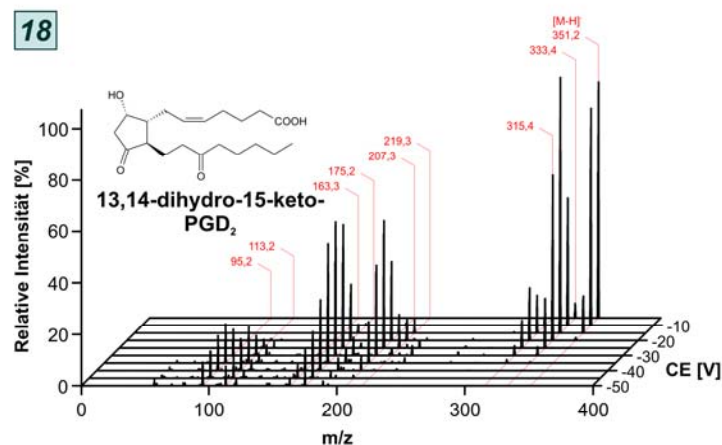
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 109,1	-41	-160	-34	-7
351,2	→ 113,2	-41	-160	-36	-7
351,2	→ 175,1	-41	-160	-30	-13
351,2	→ 235,0	-41	-160	-30	-7
351,2	→ 315,1	-41	-160	-28	-9
351,2	→ 333,0	-41	-160	-18	-9

18



13,14-dihydro-15-keto-PGD₂

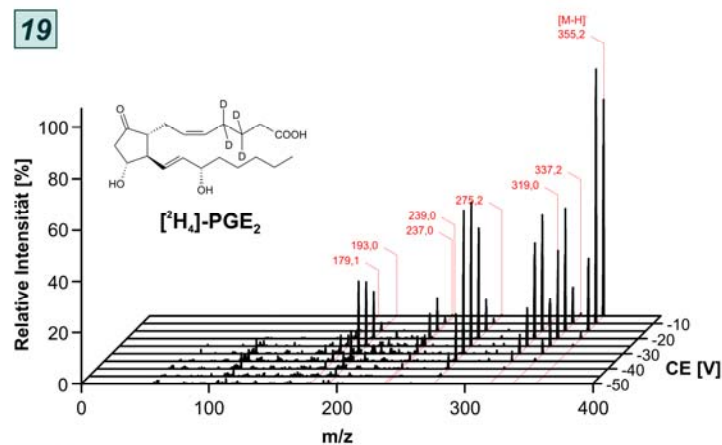
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 95,2	-46	-320	-40	-7
351,2	→ 113,2	-46	-320	-40	-7
351,2	→ 163,3	-46	-320	-36	-11
351,2	→ 175,2	-46	-320	-28	-13
351,2	→ 207,3	-46	-320	-26	-1
351,2	→ 219,3	-46	-320	-22	-17
351,2	→ 315,4	-46	-320	-20	-25
351,2	→ 333,4	-46	-320	-16	-1

19



[²H₄]-PGE₂

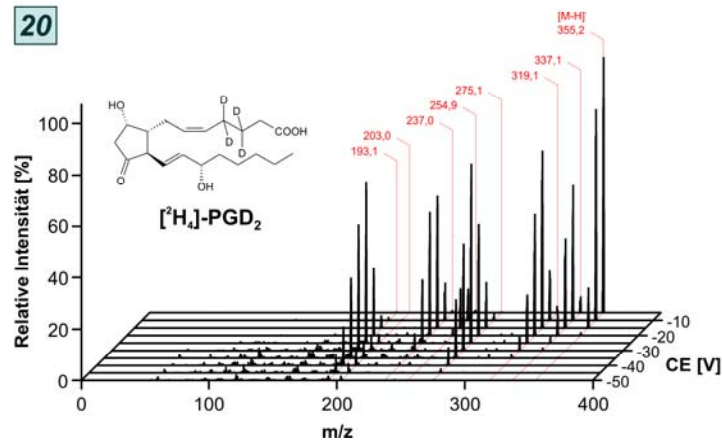
C₂₀H₂₈D₄O₅

Molekularmasse 356,5 amu

Monoisotopische Masse 356,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
355,2	→ 179,1	-31	-220	-28	-15
355,2	→ 193,0	-31	-220	-26	-7
355,2	→ 237,0	-31	-220	-18	-5
355,2	→ 239,0	-31	-220	-28	-19
355,2	→ 275,2	-31	-220	-24	-15
355,2	→ 319,0	-31	-220	-18	-3
355,2	→ 337,2	-31	-220	-18	-5

20



[²H₄]-PGD₂

C₂₀H₂₈D₄O₅

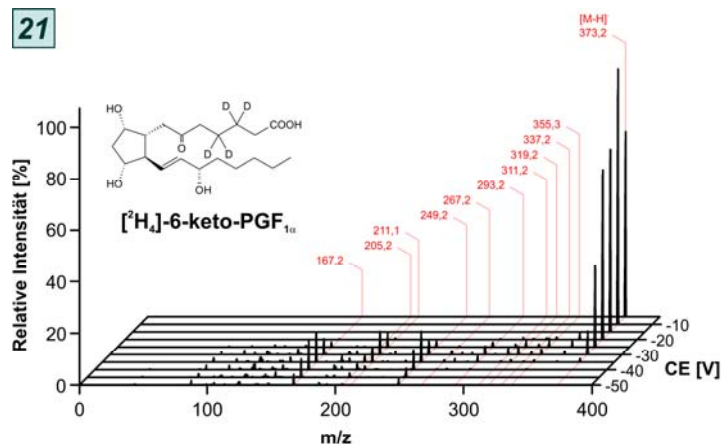
Molekularmasse 356,5 amu

Monoisotopische Masse 356,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
355,2	→ 193,1	-22	-100	-26	-11
355,2	→ 203,0	-22	-100	-38	-11
355,2	→ 237,0	-22	-100	-17	-10
355,2	→ 254,9	-22	-100	-18	-5
355,2	→ 275,1	-22	-100	-24	-18
355,2	→ 319,1	-22	-100	-17	-14
355,2	→ 337,1	-22	-100	-12	-4

Quantifier Qualifier Verunreinigung

21


[²H₄]-6-keto-PGF_{1α}

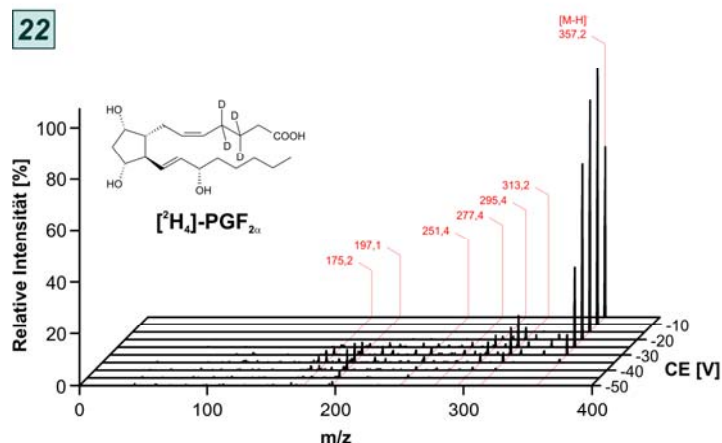
C₂₀H₃₀D₄O₆

Molekularmasse 374,5 amu

Monoisotopische Masse 374,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
373,2	→ 167,2	-91	-350	-38	-3
373,2	→ 205,2	-91	-350	-32	-1
373,2	→ 211,1	-91	-350	-30	-5
373,2	→ 249,2	-91	-350	-38	-1
373,2	→ 267,2	-91	-350	-28	-5
373,2	→ 293,2	-91	-350	-32	-11
373,2	→ 311,2	-91	-350	-28	-15
373,2	→ 319,2	-91	-350	-30	-5
373,2	→ 337,2	-91	-350	-26	-19
373,2	→ 355,3	-91	-350	-26	-11

22


[²H₄]-PGF_{2α}

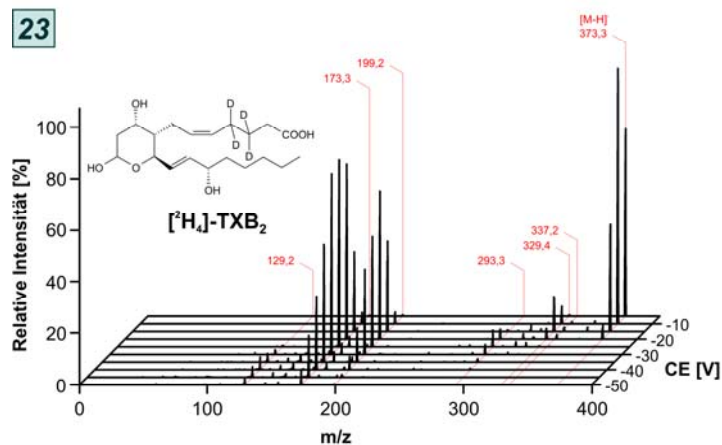
C₂₀H₃₀D₄O₅

Molekularmasse 358,5 amu

Monoisotopische Masse 358,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
357,2	→ 175,2	-81	-280	-34	-13
357,2	→ 197,1	-81	-280	-34	-13
357,2	→ 251,4	-81	-280	-32	-9
357,2	→ 277,4	-81	-280	-30	-5
357,2	→ 295,4	-81	-280	-30	-15
357,2	→ 313,2	-81	-280	-26	-7

23


[²H₄]-TXB₂

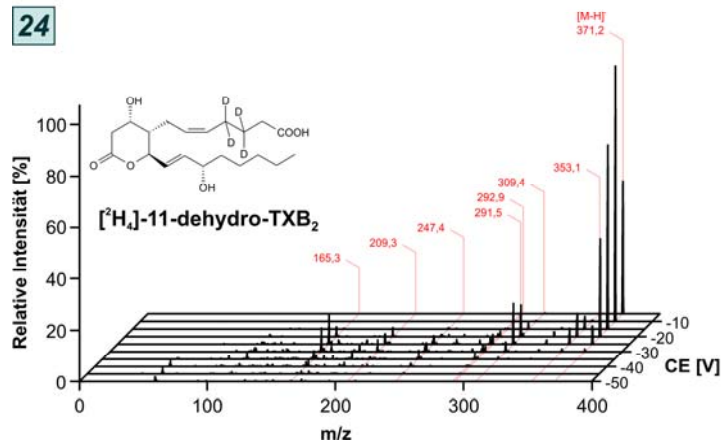
C₂₀H₃₀D₄O₆

Molekularmasse 374,5 amu

Monoisotopische Masse 374,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
373,3	→ 129,2	-46	-310	-32	-11
373,3	→ 173,3	-46	-310	-28	-7
373,3	→ 199,2	-46	-310	-18	-13
373,3	→ 293,3	-46	-310	-24	-11
373,3	→ 329,4	-46	-310	-16	-6
373,3	→ 337,2	-46	-310	-16	-5

24


[²H₄]-11-dehydro-TXB₂

C₂₀H₂₈D₄O₆

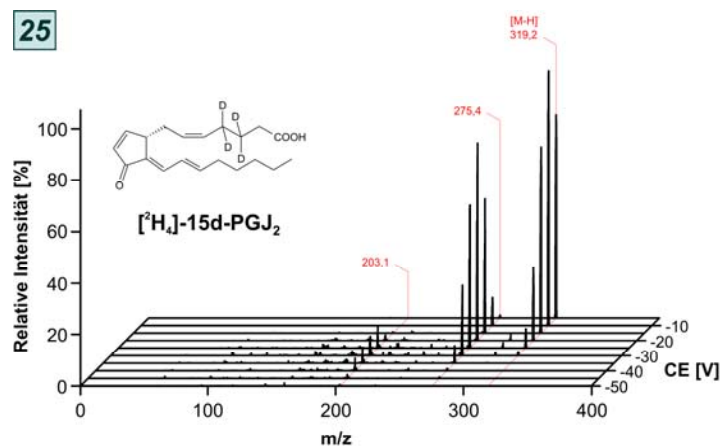
Molekularmasse 372,5 amu

Monoisotopische Masse 372,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
371,1	→ 165,3	-41	-210	-26	-7
371,1	→ 209,3	-41	-210	-26	-15
371,1	→ 247,4	-41	-210	-28	-21
371,1	→ 291,5	-41	-210	-30	-5
371,1	→ 292,9	-41	-210	-30	-15
371,1	→ 309,4	-41	-210	-24	-25
371,1	→ 353,1	-41	-210	-20	-25

Quantifier Qualifier Verunreinigung

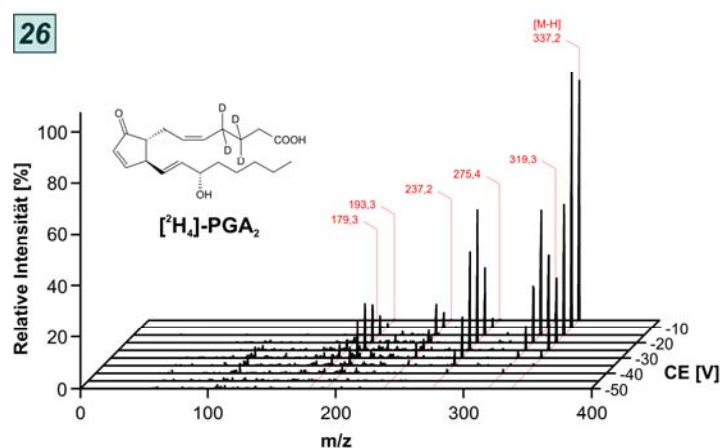
25



[²H₄]-15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂, [²H₄]-15d-PGJ₂
C₂₀H₃₂D₄O₃
Molekularmasse 320,5 amu
Monoisotopische Masse 320,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
319,2	→ 203,1	-71	-300	-28	-15
319,2	→ 275,4	-71	-300	-18	-7

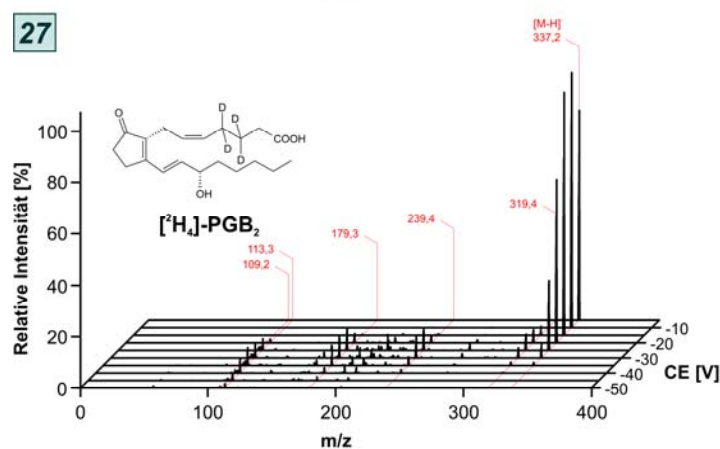
26



[²H₄]-PGA₂
C₂₀H₂₆D₄O₄
Molekularmasse 338,5 amu
Monoisotopische Masse 338,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
337,2	→ 179,3	-81	-190	-26	-11
337,2	→ 193,3	-81	-190	-22	-15
337,2	→ 237,2	-81	-190	-16	-7
337,2	→ 275,4	-81	-190	-24	-11
337,2	→ 319,3	-81	-190	-12	-12

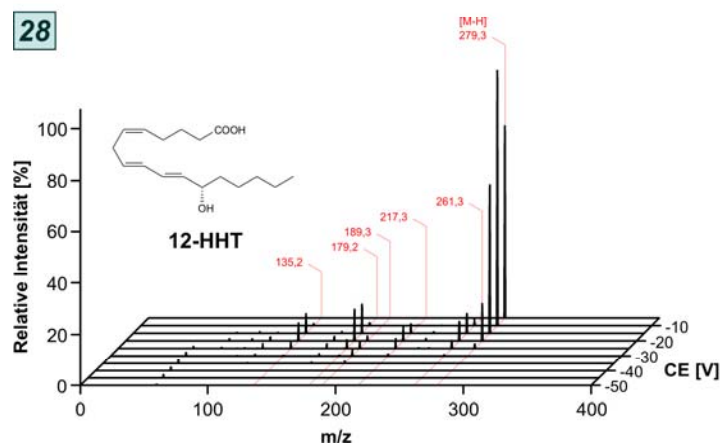
27



[²H₄]-PGB₂
C₂₀H₂₆D₄O₄
Molekularmasse 338,5 amu
Monoisotopische Masse 338,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
337,2	→ 109,2	-51	-330	-32	-11
337,2	→ 113,3	-51	-330	-32	-13
337,2	→ 179,3	-51	-330	-24	-7
337,2	→ 239,4	-51	-330	-30	-13
337,2	→ 319,4	-51	-330	-20	-5

28

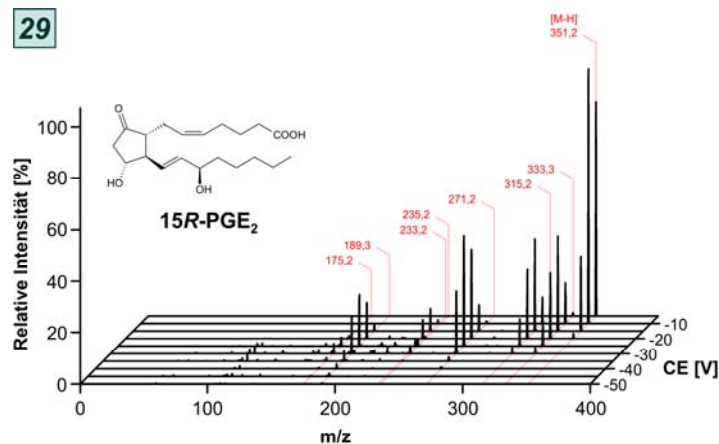


12-HHT
C₁₇H₂₈O₃
Molekularmasse 280,4 amu
Monoisotopische Masse 280,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
279,3	→ 135,2	-51	-290	-18	-9
279,3	→ 179,2	-51	-290	-18	-9
279,3	→ 189,3	-51	-290	-26	-17
279,3	→ 217,3	-51	-290	-22	-15
279,3	→ 261,3	-51	-290	-18	-17

Quantifier Qualifier Verunreinigung

29

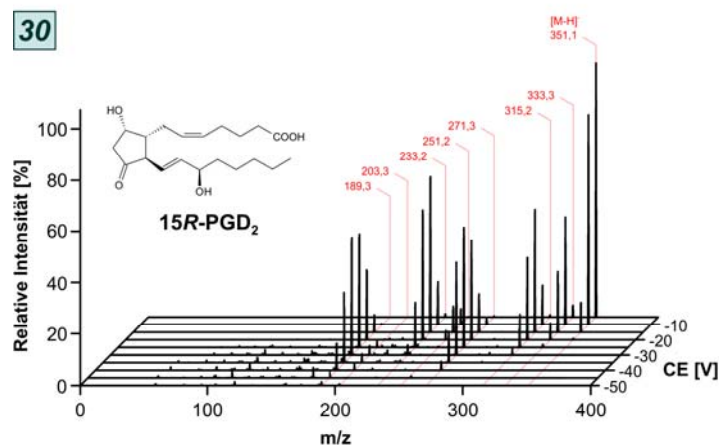

15R-PGE₂
C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 175,2	-41	-230	-28	-13
351,2	→ 189,3	-41	-230	-26	-15
351,2	→ 233,2	-41	-230	-16	-19
351,2	→ 235,2	-41	-230	-28	-21
351,2	→ 271,2	-41	-230	-24	-21
351,2	→ 315,2	-41	-230	-16	-19
351,2	→ 333,3	-41	-230	-16	-5

30

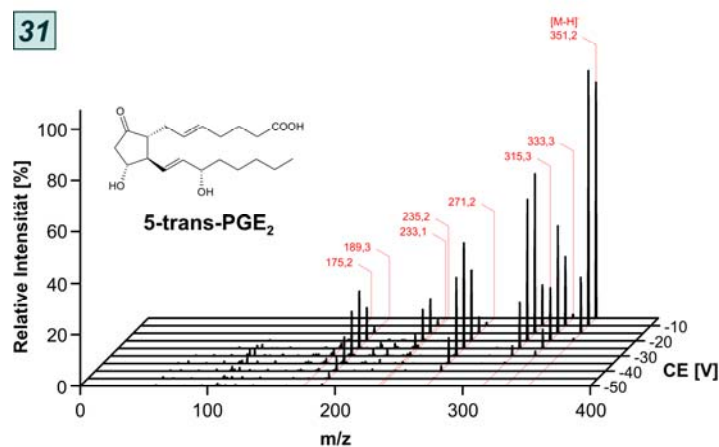

15R-PGD₂
C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 189,3	-36	-200	-26	-15
351,2	→ 203,3	-36	-200	-34	-15
351,2	→ 233,2	-36	-200	-18	-17
351,2	→ 251,2	-36	-200	-14	-13
351,2	→ 271,3	-36	-200	-24	-5
351,2	→ 315,2	-36	-200	-16	-17
351,2	→ 333,3	-36	-200	-12	-7

31

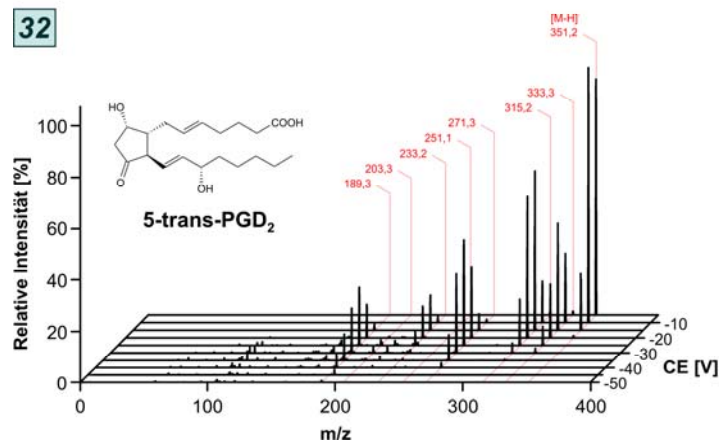

5-trans-PGE₂
C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 175,2	-36	-200	-28	-11
351,2	→ 189,3	-36	-200	-26	-13
351,2	→ 233,1	-36	-200	-18	-17
351,2	→ 271,2	-36	-200	-24	-15
351,2	→ 315,3	-36	-200	-16	-19
351,2	→ 333,3	-36	-200	-14	-5

32


5-trans-PGD₂
C20H32O5

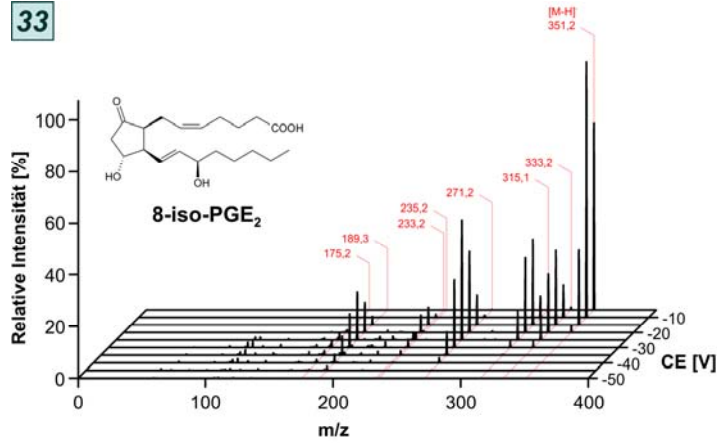
Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 189,3	-26	-150	-28	-13
351,2	→ 203,3	-26	-150	-34	-17
351,2	→ 233,2	-26	-150	-18	-19
351,2	→ 251,1	-26	-150	-14	-17
351,2	→ 271,3	-26	-150	-26	-21
351,2	→ 315,2	-26	-150	-16	-17
351,2	→ 333,2	-26	-150	-12	-19

Quantifier Qualifier Verunreinigung

33



8-iso-PGE₂

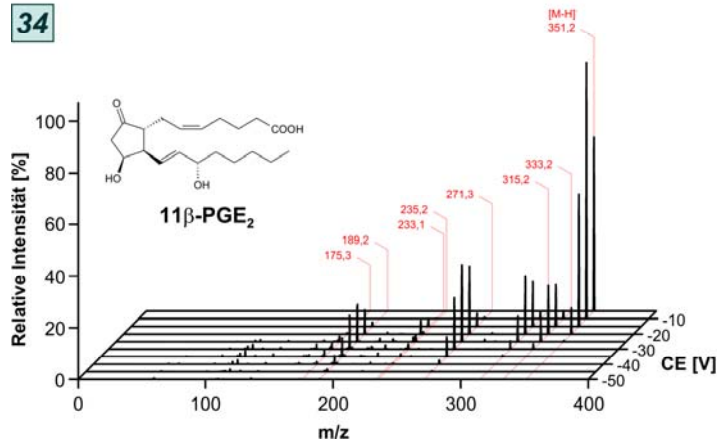
C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 175,2	-41	-220	-28	-13
351,2	→ 189,3	-41	-220	-24	-13
351,2	→ 233,2	-41	-220	-18	-19
351,2	→ 235,2	-41	-220	-28	-17
351,2	→ 271,2	-41	-220	-24	-21
351,2	→ 315,1	-41	-220	-16	-21
351,2	→ 333,2	-41	-220	-16	-19

34



11β-PGE₂

C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	FP	CE	CXP
351,2	→ 175,3	-26	-160	-28	-13
351,2	→ 189,2	-26	-160	-26	-11
351,2	→ 233,1	-26	-160	-20	-13
351,2	→ 235,2	-26	-160	-28	-17
351,2	→ 271,3	-26	-160	-24	-15
351,2	→ 315,2	-26	-160	-18	-17
351,2	→ 333,2	-26	-160	-18	-19

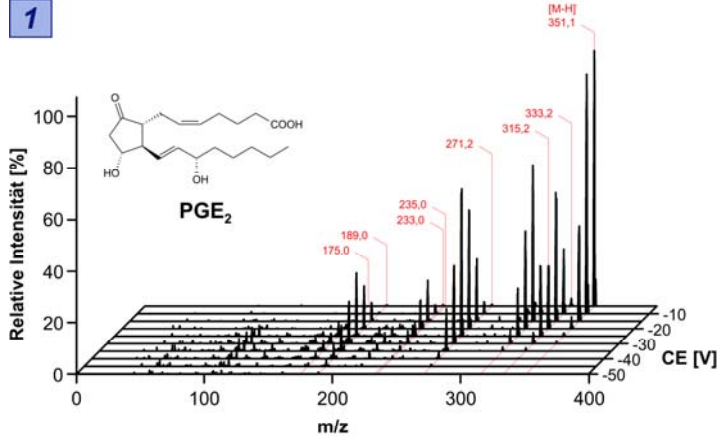
Quantifier Qualifier Verunreinigung

14. Anhang II – Massenspektren am API 4000

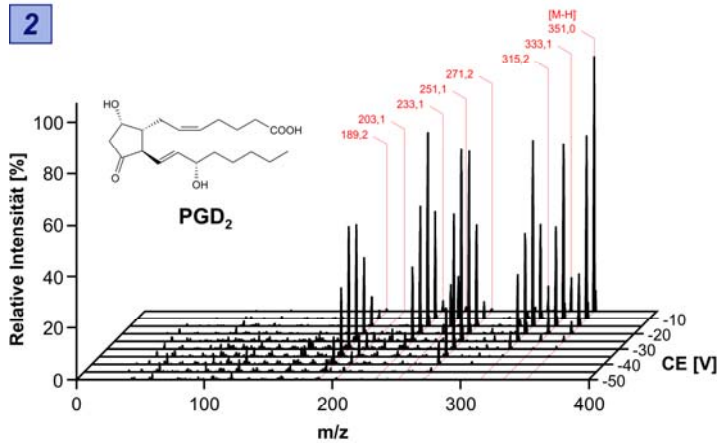
Nr. Eicosanoid	Konzentration	Nr. Eicosanoid	Konzentration
1 PGE ₂ (15S-PGE ₂)	250 ng/ml	21 [² H ₄]-6-keto-PGF _{1α}	1.000 ng/ml
2 PGD ₂ (15S-PGD ₂)	250 ng/ml	22 [² H ₄]-PGF _{2α}	500 ng/ml
3 6-keto-PGF _{1α}	1.000 ng/ml	23 [² H ₄]-TXB ₂	250 ng/ml
4 PGF _{2α}	1.000 ng/ml	24 [² H ₄]-11-dehydro-TXB ₂	250 ng/ml
5 PGG ₂	nicht mehr verfügbar	25 [² H ₄]-15d-PGJ ₂	100 ng/ml
6 PGH ₂	250 ng/ml	26 [² H ₄]-PGA ₂	250 ng/ml
7 PGA ₂	250 ng/ml	27 [² H ₄]-PGB ₂	250 ng/ml
8 PGB ₂	250 ng/ml	28 12-HHT	250 ng/ml
9 Lipoxin A ₄	250 ng/ml	29 15R-PGE ₂	250 ng/ml
10 TXB ₂	250 ng/ml	30 15R-PGD ₂	250 ng/ml
11 11-dehydro-TXB ₂	250 ng/ml	31 5-trans-PGE ₂	250 ng/ml
12 PGJ ₂	1.000 ng/ml	32 5-trans-PGD ₂	250 ng/ml
13 Δ ¹² -PGJ ₂	250 ng/ml	33 8-iso-PGE ₂	250 ng/ml
14 Δ ¹² -PGD ₂	250 ng/ml	34 11β-PGE ₂	250 ng/ml
15 15d-PGJ ₂	100 ng/ml		
16 15d-PGD ₂	100 ng/ml		
17 13,14-dihydro-15-keto-PGE ₂	250 ng/ml		
18 13,14-dihydro-15-keto-PGD ₂	250 ng/ml		
19 [² H ₄]-PGE ₂	250 ng/ml		
20 [² H ₄]-PGD ₂	250 ng/ml		

Bedingungen

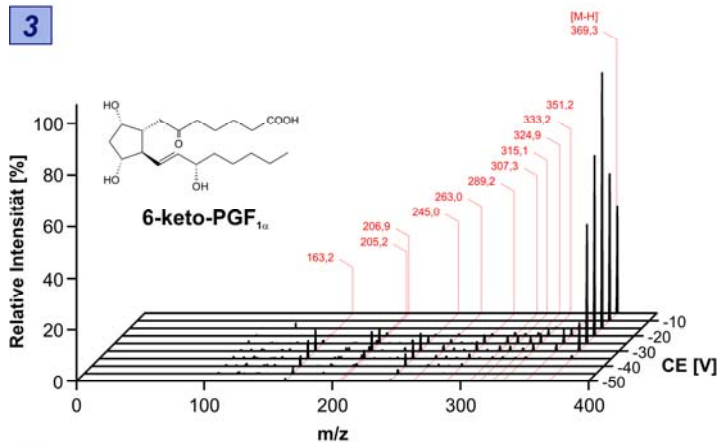
Jede Substanz wurde auf die angegebene Konzentration mit Methanol verdünnt und die Lösung nach dem automatischen Tuning der Analyst-Software mit einer Geschwindigkeit von 10 µl/min in das API 4000 infundiert und ein Produkt-Ionen-Scan durchgeführt. Als Ausgangsmasse für den Produkt-Ionen-Scan diente der Software-optimierte [M-H]⁻-Peak der entsprechenden Substanz. DP wurde auf die Software-optimierten Spannungen der entsprechenden Substanz eingestellt. EP betrug in allen Scans -10 V und CXP -15 V. Innerhalb einer Sekunde wurde der Bereich von 20 amu bis [M-H]⁻ + 10 amu abgescannt und 20 dieser Scans aufsummiert. Die Kollisionsenergie, CE, wurde von -5 V bis -50 V im Abstand von 5 V variiert. Die erhaltenen 10 Produkt-Ionen-Scans (CE 5 V - 50 V, Abstand 5V) wurden in Excel auf den höchsten Peak der 10 Scans normalisiert, und über SigmaPlot und CorelDraw zu einem 3D-Diagramm zusammengefügt. Die Tabellen sind die Resultate der Tuning-Automatik der Analyst-Software. PGG₂ war zu dem Zeitpunkt nicht mehr verfügbar. Sonstige Einstellungen: CUR 20 psi, GS1 15 psi, GS2 0 psi, CAD 6 psi und IS -4500 V, T 0 °C und Interface-Heater ON.



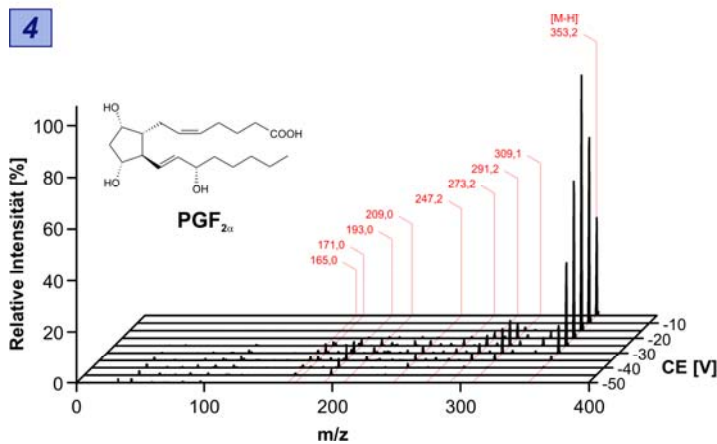
[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,1	→ 175,0	-46	-5,5	-28	-15
351,1	→ 189,0	-46	-5,5	-24	-13
351,1	→ 233,0	-46	-5,5	-17	-5
351,1	→ 235,0	-46	-5,5	-28	-7
351,1	→ 271,2	-46	-5,5	-24	-7
351,1	→ 315,2	-46	-5,5	-16	-7
351,1	→ 333,2	-46	-5,5	-14	-7



[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,0	→ 189,2	-40	-3,5	-26	-5
351,0	→ 203,1	-40	-3,5	-36	-5
351,0	→ 233,1	-40	-3,5	-16	-7
351,0	→ 251,1	-40	-3,5	-12	-7
351,0	→ 271,2	-40	-3,5	-24	-7
351,0	→ 315,2	-40	-3,5	-16	-9
351,0	→ 333,1	-40	-3,5	-12	-7



[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
369,3	→ 163,2	-69	-6,5	-36	-5
369,3	→ 205,2	-69	-6,5	-32	-3
369,3	→ 206,9	-69	-6,5	-28	-7
369,3	→ 245,0	-69	-6,5	-36	-5
369,3	→ 263,0	-69	-6,5	-26	-9
369,3	→ 289,2	-69	-6,5	-28	-3
369,3	→ 307,3	-69	-6,5	-24	-9
369,3	→ 315,1	-69	-6,5	-26	-11
369,3	→ 324,9	-69	-6,5	-26	-11
369,3	→ 333,2	-69	-6,5	-24	-5
369,3	→ 351,2	-69	-6,5	-24	-1



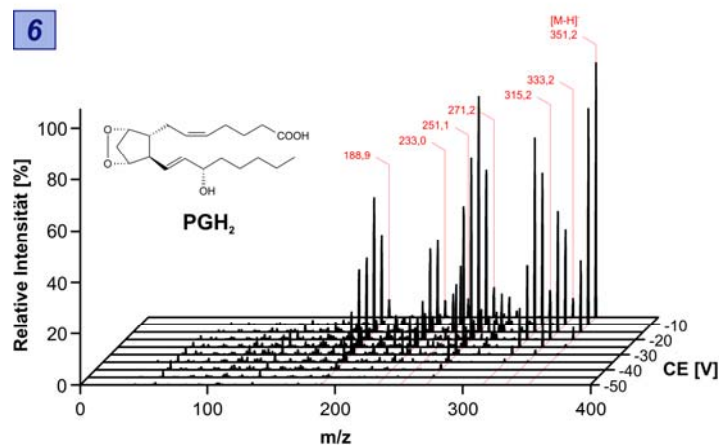
[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
353,2	→ 165,0	-65	-3	-34	-9
353,2	→ 171,0	-65	-3	-32	-1
353,2	→ 193,0	-65	-3	-34	-11
353,2	→ 209,0	-65	-3	-28	-13
353,2	→ 247,2	-65	-3	-30	-7
353,2	→ 273,2	-65	-3	-28	-13
353,2	→ 291,2	-65	-3	-28	-9
353,2	→ 309,1	-65	-3	-26	-7

Quantifier Qualifier Verunreinigung

5

PGG₂ stand leider nicht mehr zur Verfügung.

6



PGH₂

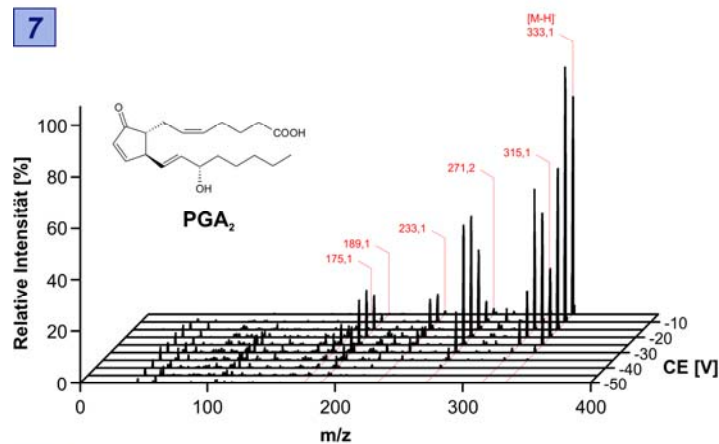
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 188,9	-45	-10	-14	-7
351,2	→ 233,0	-45	-10	-12	-15
351,2	→ 251,1	-45	-10	-10	-7
351,2	→ 271,2	-45	-10	-11	-5
351,2	→ 315,2	-45	-10	-12	-9
351,2	→ 333,2	-45	-10	-12	-7

7



PGA₂

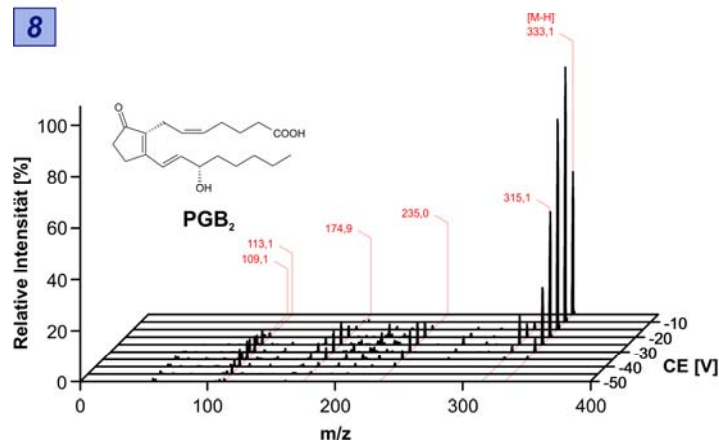
C₂₀H₃₀O₄

Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
333,1	→ 175,1	-50	-6	-28	-3
333,1	→ 189,1	-50	-6	-22	-11
333,1	→ 233,1	-50	-6	-28	-9
333,1	→ 271,2	-50	-6	-20	-7
333,1	→ 315,1	-50	-6	-12	-9

8



PGB₂

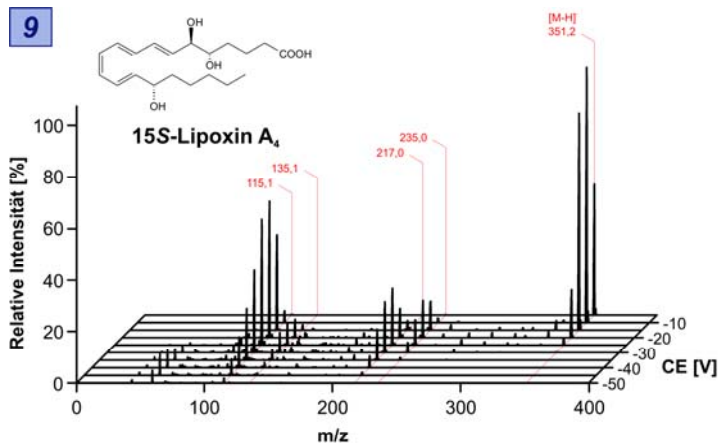
C₂₀H₃₀O₄

Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
333,1	→ 109,1	-90	-10	-30	-7
333,1	→ 113,1	-90	-10	-30	-7
333,1	→ 174,9	-90	-10	-26	-11
333,1	→ 235,0	-90	-10	-26	-15
333,1	→ 315,1	-90	-10	-22	-7

Quantifier Qualifier Verunreinigung

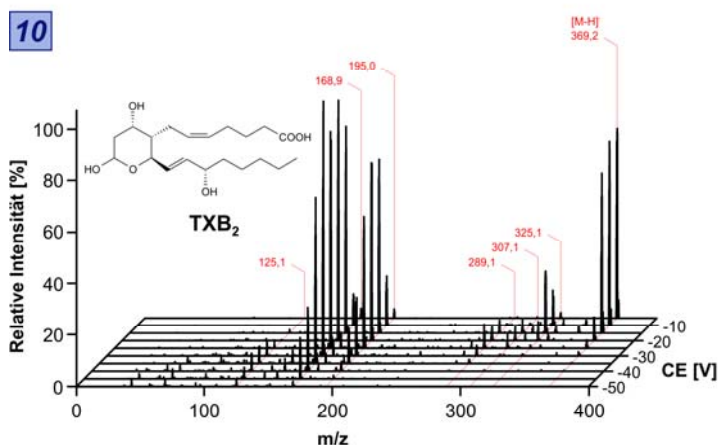

15S-Lipoxin A₄

C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁺	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 115,1	-60	-10	-22	-7
351,2	→ 135,1	-60	-10	-24	-5
351,2	→ 217,0	-60	-10	-24	-7
351,2	→ 235,0	-60	-10	-18	-9

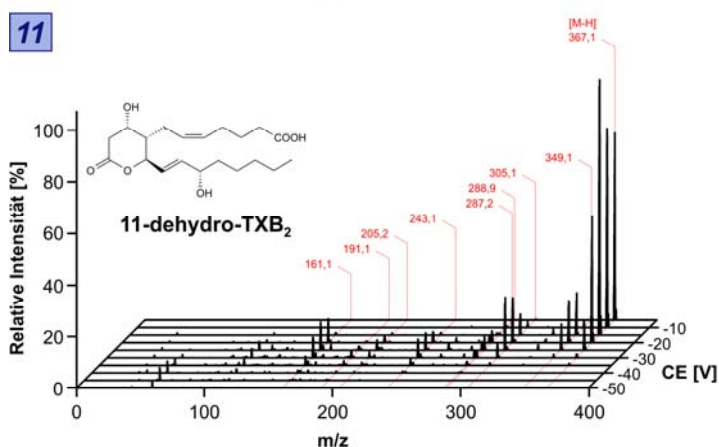

TXB₂

C₂₀H₃₄O₆

Molekularmasse 370,5 amu

Monoisotopische Masse 370,2 amu

[M-H] ⁺	Fragment	DP	EP	CE	CXP
369,2	→ 125,1	-44	-4	-36	-9
369,2	→ 168,9	-44	-4	-24	-11
369,2	→ 195,0	-44	-4	-20	-5
369,2	→ 289,1	-44	-4	-24	-7
369,2	→ 307,1	-44	-4	-18	-7
369,2	→ 325,1	-44	-4	-14	-7

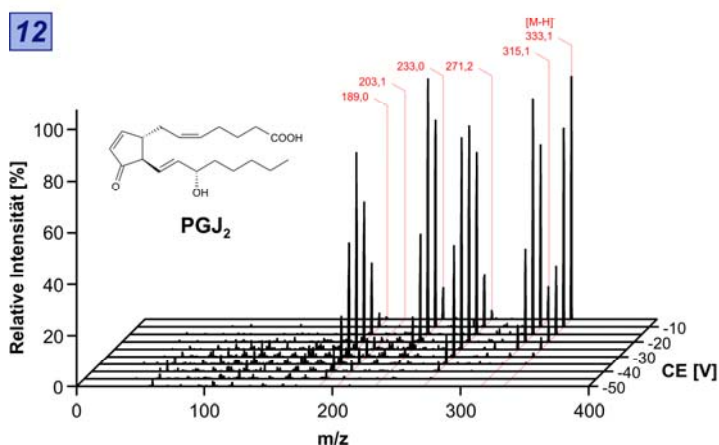

11-dehydro-TXB₂

C₂₀H₃₂O₆

Molekularmasse 368,5 amu

Monoisotopische Masse 368,2 amu

[M-H] ⁺	Fragment	DP	EP	CE	CXP
367,1	→ 161,1	-56	-5	-26	-9
367,1	→ 191,1	-56	-5	-28	-7
367,1	→ 205,2	-56	-5	-24	-7
367,1	→ 243,1	-56	-5	-24	-5
367,1	→ 287,2	-56	-5	-28	-7
367,1	→ 288,9	-56	-5	-24	-9
367,1	→ 305,1	-56	-5	-22	-7
367,1	→ 349,1	-56	-5	-20	-9


PGJ₂

C₂₀H₃₀O₄

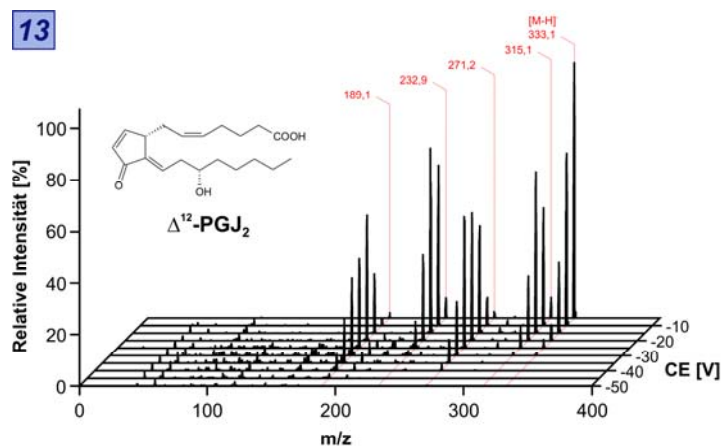
Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁺	Fragment	DP	EP	CE	CXP
333,1	→ 189,0	-50	-10	-24	-11
333,1	→ 203,1	-50	-10	-36	-9
333,1	→ 233,0	-50	-10	-14	-13
333,1	→ 271,2	-50	-10	-22	-7
333,1	→ 315,1	-50	-10	-12	-9

Quantifier Qualifier Verunreinigung

13


 Δ^{12} -PGJ₂

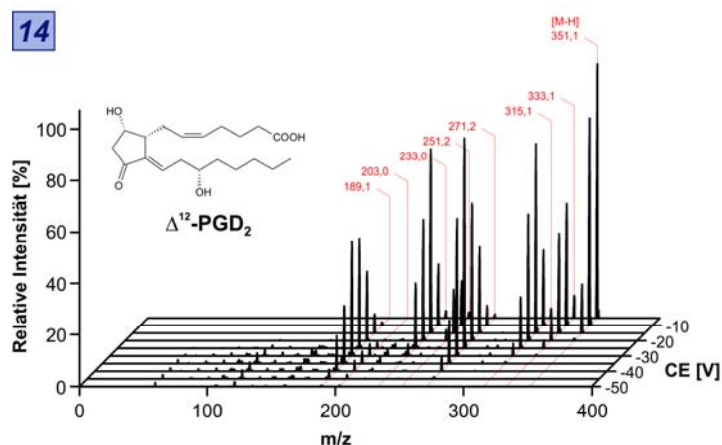
C₂₀H₃₀O₄

Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
333,1	→ 189,1	-39	-5,5	-24	-11
333,1	→ 232,9	-39	-5,5	-14	-15
333,1	→ 271,2	-39	-5,5	-22	-7
333,1	→ 315,1	-39	-5,5	-14	-9

14


 Δ^{12} -PGD₂

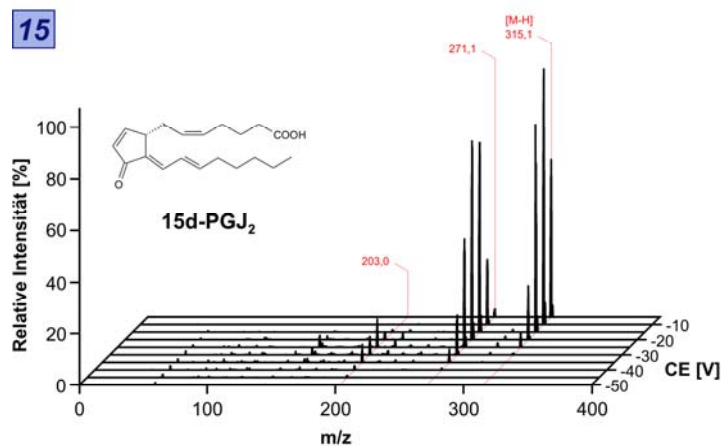
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,1	→ 189,1	-57	-10	-26	-11
351,1	→ 203,0	-57	-10	-36	-13
351,1	→ 233,0	-57	-10	-18	-5
351,1	→ 251,2	-57	-10	-12	-7
351,1	→ 271,2	-57	-10	-24	-7
351,1	→ 315,1	-57	-10	-16	-7
351,1	→ 333,1	-57	-10	-12	-9

15


15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ₂, 15d-PGJ₂

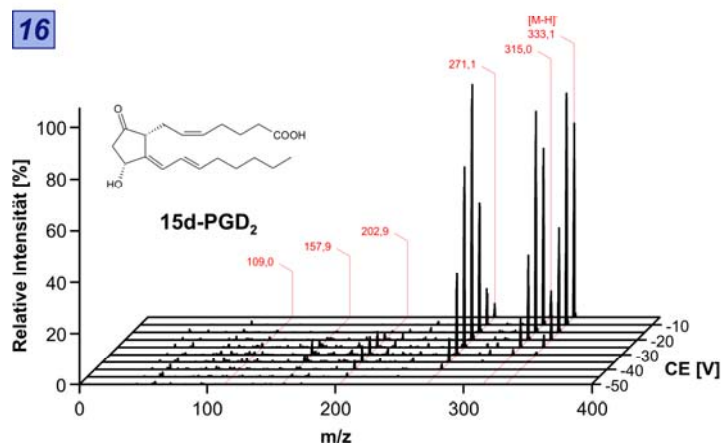
C₂₀H₃₆O₃

Molekularmasse 316,4 amu

Monoisotopische Masse 316,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
315,1	→ 203,0	-45	-3,5	-28,5	-12
315,1	→ 271,1	-45	-3,5	-18,5	-7

16


15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGD₂, 15d-PGD₂

C₂₀H₃₀O₄

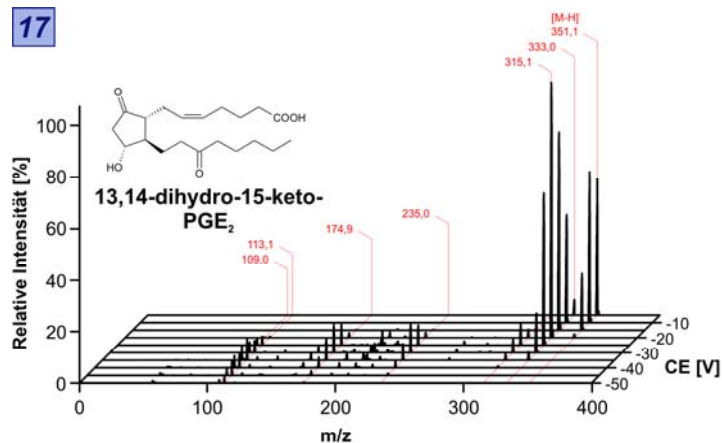
Molekularmasse 334,5 amu

Monoisotopische Masse 334,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
333,1	→ 109,0	-75	-10	-30	-5
333,1	→ 157,9	-75	-10	-30	-9
333,1	→ 202,9	-75	-10	-30	-13
333,1	→ 271,1	-75	-10	-22	-7
333,1	→ 315,1	-75	-10	-14	-9

Quantifier Qualifier Verunreinigung

17



13,14-dihydro-15-keto-PGE₂

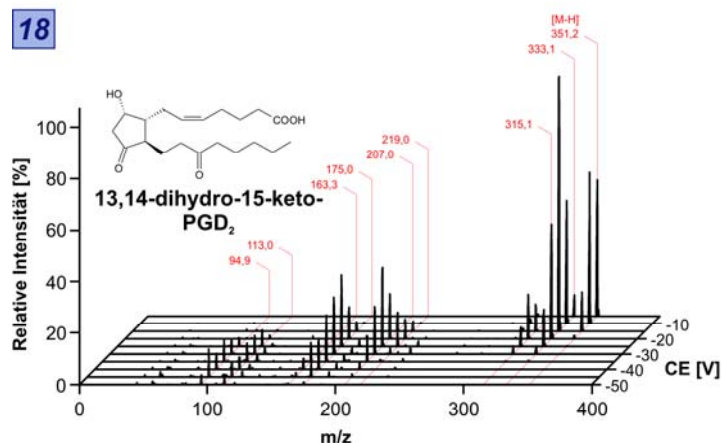
C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,1	→ 109,0	-55	-10	-34	-7
351,1	→ 113,1	-55	-10	-36	-7
351,1	→ 174,9	-55	-10	-30	-11
351,1	→ 235,0	-55	-10	-30	-15
351,1	→ 315,1	-55	-10	-26	-7
351,1	→ 333,0	-55	-10	-18	-9

18



13,14-dihydro-15-keto-PGD₂

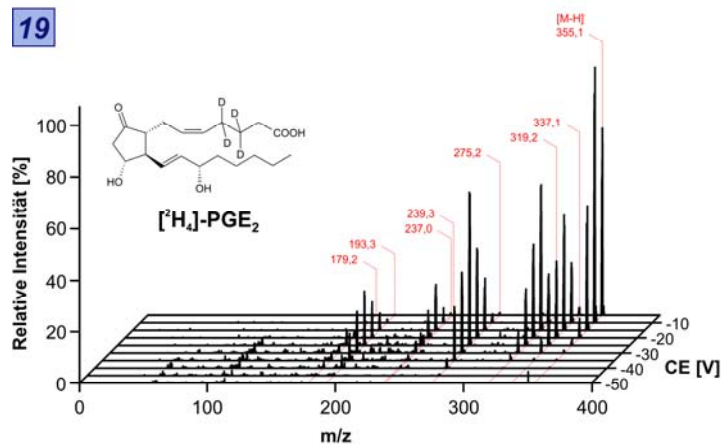
C20H32O5

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,1	→ 94,9	-53	-10	-36	-5
351,1	→ 113,0	-53	-10	-36	-7
351,1	→ 163,0	-53	-10	-30	-11
351,1	→ 175,0	-53	-10	-26	-9
351,1	→ 207,0	-53	-10	-26	-17
351,1	→ 219,0	-53	-10	-24	-5
351,1	→ 315,1	-53	-10	-26	-9
351,1	→ 333,1	-53	-10	-14	-9

19



[²H₄]-PGE₂

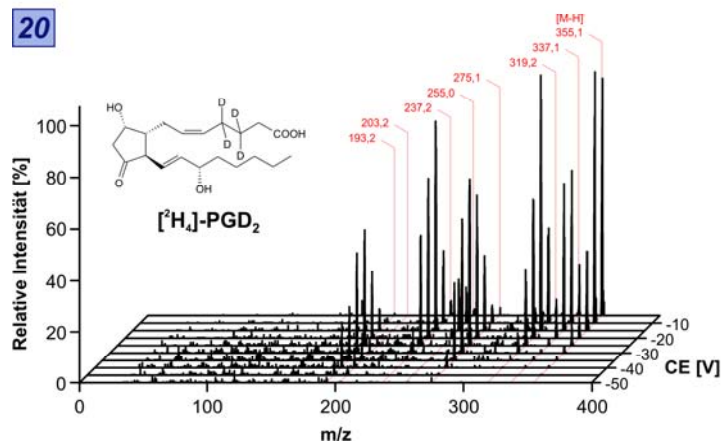
C20H28D4O5

Molekularmasse 356,5 amu

Monoisotopische Masse 356,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
355,1	→ 179,2	-46	-5,5	-28	-3
355,1	→ 193,3	-46	-5,5	-26	-5
355,1	→ 237,0	-46	-5,5	-16	-7
355,1	→ 239,3	-46	-5,5	-28	-7
355,1	→ 275,2	-46	-5,5	-24	-7
355,1	→ 319,2	-46	-5,5	-16	-7
355,1	→ 337,1	-46	-5,5	-16	-9

20



[²H₄]-PGD₂

C20H28D4O5

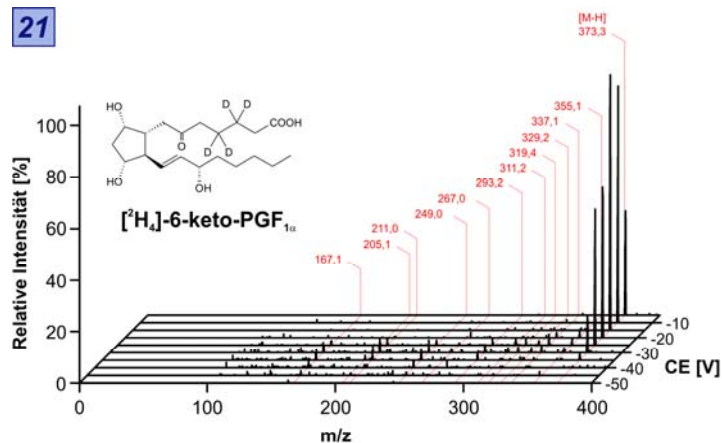
Molekularmasse 356,5 amu

Monoisotopische Masse 356,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
355,1	→ 193,2	-40	-3,5	-26	-5
355,1	→ 203,2	-40	-3,5	-36	-5
355,1	→ 237,2	-40	-3,5	-16	-7
355,1	→ 255,0	-40	-3,5	-12	-7
355,1	→ 275,1	-40	-3,5	-24	-7
355,1	→ 319,2	-40	-3,5	-16	-9
355,1	→ 337,1	-40	-3,5	-12	-9

Quantifier Qualifier Verunreinigung

21



[²H₄]-6-keto-PGF_{1α}

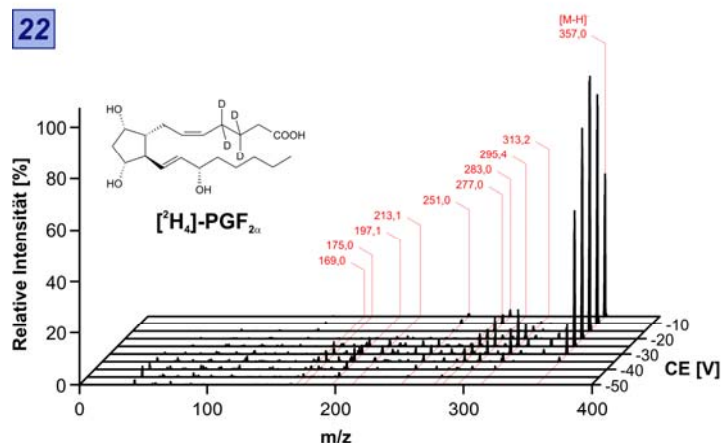
C20H30D4O6

Molekularmasse 374,5 amu

Monoisotopische Masse 374,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
373,3	→ 167,1	-69	-6,5	-36	-5
373,3	→ 205,1	-69	-6,5	-30	-9
373,3	→ 211,0	-69	-6,5	-30	-5
373,3	→ 249,0	-69	-6,5	-36	-5
373,3	→ 267,0	-69	-6,5	-28	-15
373,3	→ 293,2	-69	-6,5	-28	-5
373,3	→ 311,2	-69	-6,5	-26	-9
373,3	→ 319,4	-69	-6,5	-28	-7
373,3	→ 329,2	-69	-6,5	-26	-9
373,3	→ 337,1	-69	-6,5	-26	-3
373,3	→ 355,1	-69	-6,5	-24	-9

22



[²H₄]-PGF_{2α}

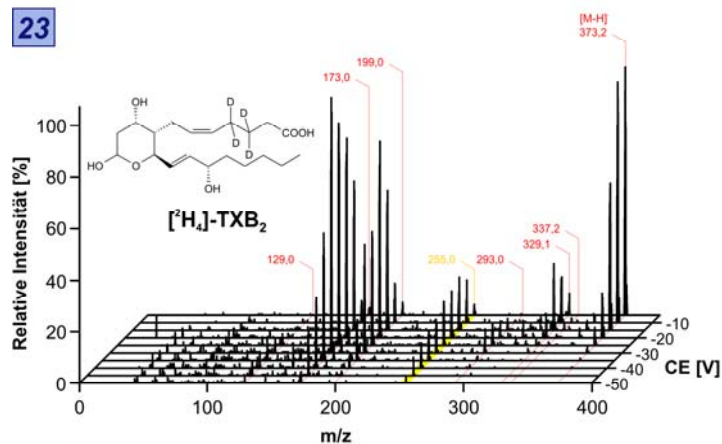
C20H30D4O5

Molekularmasse 358,5 amu

Monoisotopische Masse 358,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
357,0	→ 169,0	-65	-3	-34	-15
357,0	→ 175,0	-65	-3	-30	-5
357,0	→ 197,1	-65	-3	-36	-5
357,0	→ 213,1	-65	-3	-30	-15
357,0	→ 251,0	-65	-3	-30	-9
357,0	→ 277,0	-65	-3	-28	-5
357,0	→ 283,0	-65	-3	-22	-7
357,0	→ 295,4	-65	-3	-28	-7
357,0	→ 313,2	-65	-3	-26	-9

23



[²H₄]-TXB₂

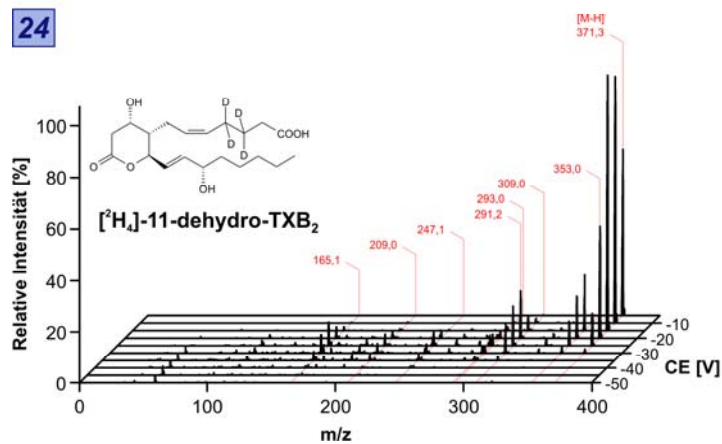
C20H30D4O6

Molekularmasse 374,5 amu

Monoisotopische Masse 374,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
373,2	→ 129,0	-44	-4	-40	-9
373,2	→ 173,0	-44	-4	-24	-9
373,2	→ 199,0	-44	-4	-20	-13
373,2	→ 255,0	-44	-4	-16	-9
373,2	→ 293,0	-44	-4	-24	-7
373,2	→ 311,2	-44	-4	-20	-7
373,2	→ 329,1	-44	-4	-24	-9

24



[²H₄]-11-dehydro-TXB₂

C20H28D4O6

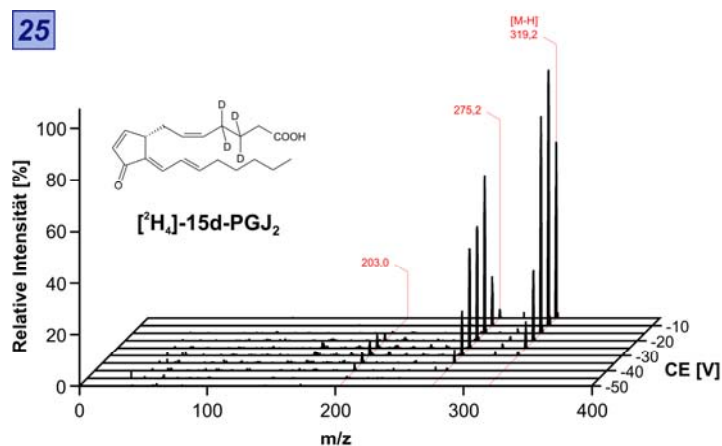
Molekularmasse 372,5 amu

Monoisotopische Masse 372,3 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
371,3	→ 165,1	-49	-4,5	-26	-9
371,3	→ 209,0	-49	-4,5	-24	-5
371,3	→ 247,1	-49	-4,5	-26	-15
371,3	→ 291,2	-49	-4,5	-24	-7
371,3	→ 293,0	-49	-4,5	-24	-9
371,3	→ 309,0	-49	-4,5	-22	-9
371,3	→ 353,0	-49	-4,5	-20	-9

Quantifier Qualifier Verunreinigung

25



[²H₄]-15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂, [²H₄]-15d-PGJ₂

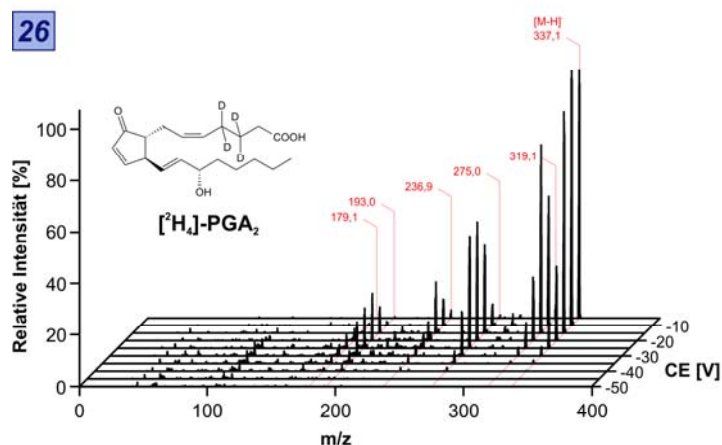
C₂₀H₃₂D₄O₃

Molekularmasse 320,5 amu

Monoisotopische Masse 320,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
319,2	→ 203,0	-45	-3,5	-29	-12
319,2	→ 275,2	-45	-3,5	-19	-7

26



[²H₄]-PGA₂

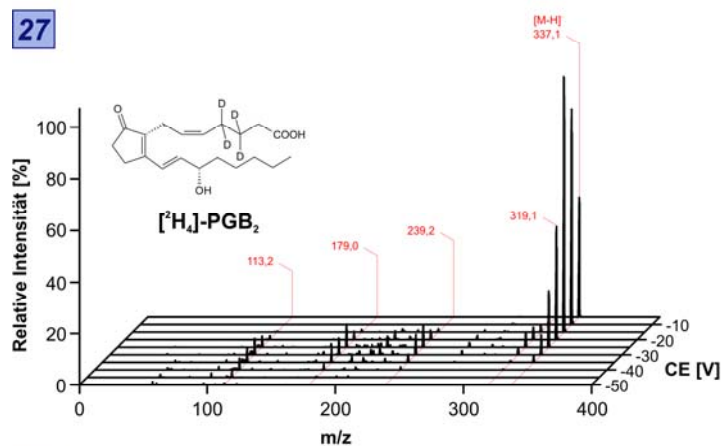
C₂₀H₂₆D₄O₄

Molekularmasse 338,5 amu

Monoisotopische Masse 338,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
337,1	→ 179,1	-55	-6	-28	-5
337,1	→ 193,0	-55	-6	-24	-5
337,1	→ 236,9	-55	-6	-14	-15
337,1	→ 275,0	-55	-6	-20	-5
337,1	→ 319,1	-55	-6	-14	-9

27



[²H₄]-PGB₂

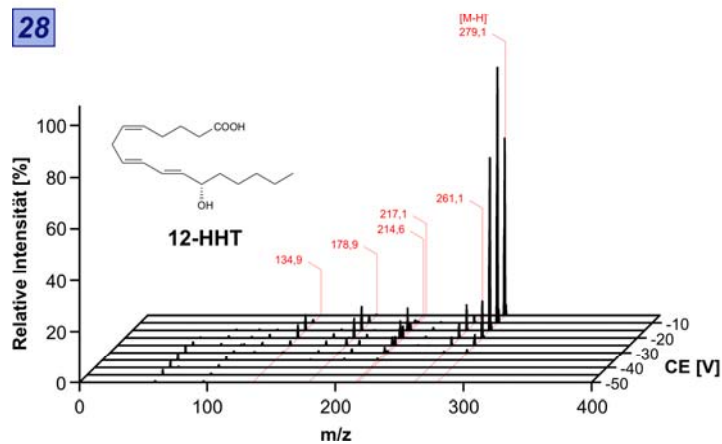
C₂₀H₂₆D₄O₄

Molekularmasse 338,5 amu

Monoisotopische Masse 338,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
337,1	→ 113,2	-75	-10	-32	-9
337,1	→ 179,0	-75	-10	-28	-9
337,1	→ 239,2	-75	-10	-28	-5
337,1	→ 319,1	-75	-10	-24	-11

28



12-HHT

C₁₇H₂₆O₃

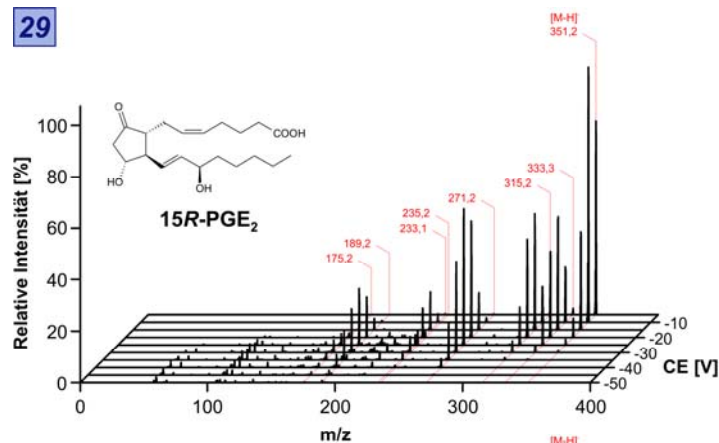
Molekularmasse 280,4 amu

Monoisotopische Masse 280,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
279,1	→ 134,9	-65	-10	-18	-11
279,1	→ 178,9	-65	-10	-18	-11
279,1	→ 214,6	-65	-10	-18	-5
279,1	→ 217,1	-65	-10	-20	-15
279,1	→ 261,1	-65	-10	-16	-7

Quantifier Qualifier Verunreinigung

29


15R-PGE₂

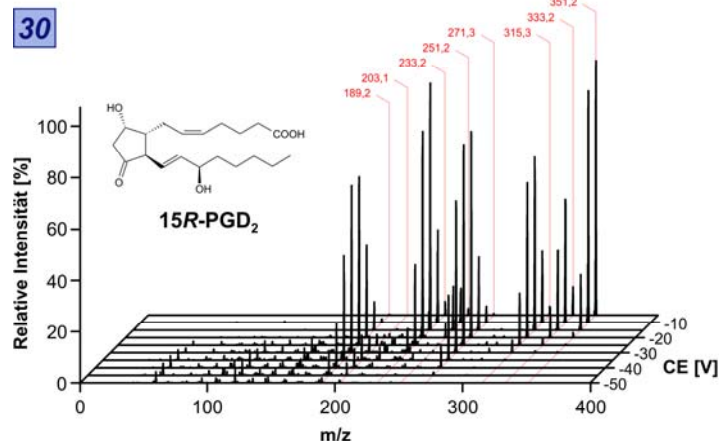
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 175,2	-60	-10	-28	-13
351,2	→ 189,2	-60	-10	-24	-15
351,2	→ 233,1	-60	-10	-16	-19
351,2	→ 235,2	-60	-10	-28	-21
351,2	→ 271,2	-60	-10	-24	-21
351,2	→ 315,2	-60	-10	-16	-19
351,2	→ 333,3	-60	-10	-16	-9

30


15R-PGD₂

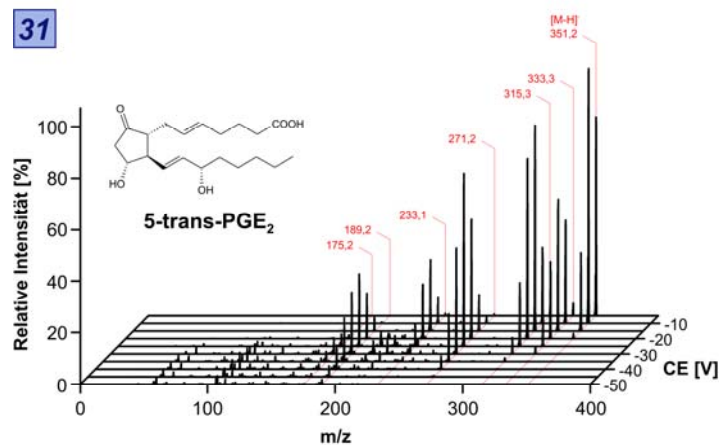
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 189,2	-45	-10	-26	-5
351,2	→ 203,1	-45	-10	-34	-5
351,2	→ 233,2	-45	-10	-16	-7
351,2	→ 251,2	-45	-10	-12	-7
351,2	→ 271,3	-45	-10	-24	-7
351,2	→ 315,3	-45	-10	-16	-9
351,2	→ 333,2	-45	-10	-12	-9

31


5-trans-PGE₂

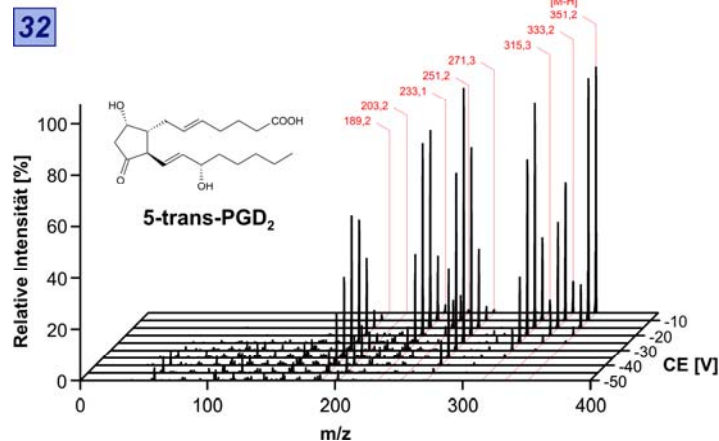
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 175,2	-65	-10	-30	-11
351,2	→ 189,2	-65	-10	-26	-5
351,2	→ 233,1	-65	-10	-18	-7
351,2	→ 271,2	-65	-10	-24	-11
351,2	→ 315,3	-65	-10	-16	-9
351,2	→ 333,3	-65	-10	-14	-9

32


5-trans-PGD₂

C₂₀H₃₂O₅

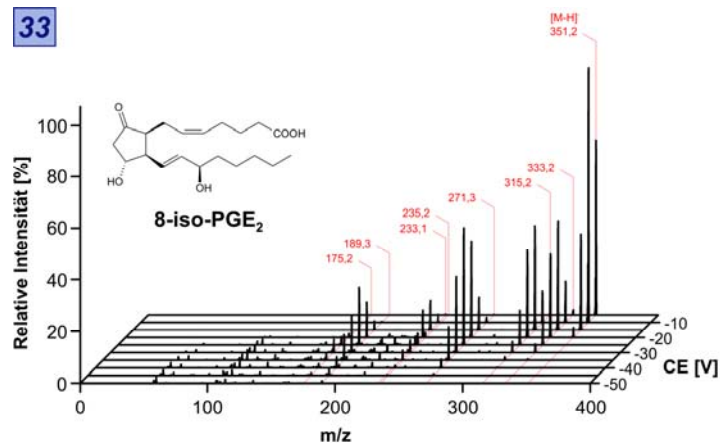
Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 189,2	-55	-10	-28	-5
351,2	→ 203,2	-55	-10	-36	-5
351,2	→ 233,1	-55	-10	-18	-23
351,2	→ 251,2	-55	-10	-14	-17
351,2	→ 271,3	-55	-10	-24	-7
351,2	→ 315,3	-55	-10	-16	-9
351,2	→ 333,2	-55	-10	-12	-9

Quantifier Qualifier Verunreinigung

33


8-iso-PGE₂

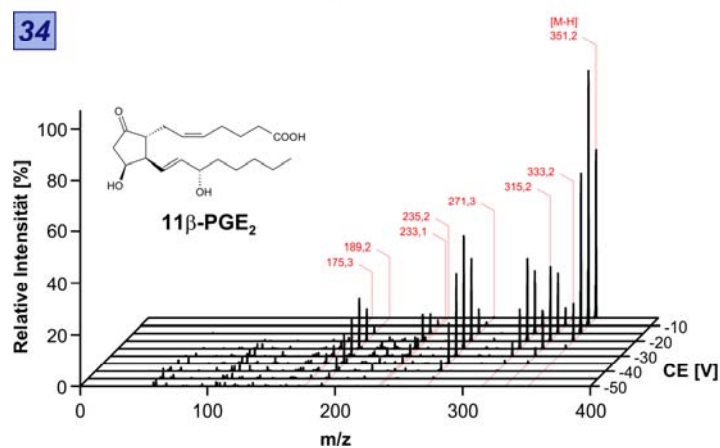
C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 175,2	-60	-10	-30	-15
351,2	→ 189,3	-60	-10	-26	-11
351,2	→ 233,1	-60	-10	-18	-7
351,2	→ 235,2	-60	-10	-28	-7
351,2	→ 271,3	-60	-10	-24	-7
351,2	→ 315,2	-60	-10	-16	-9
351,2	→ 333,2	-60	-10	-16	-9

34


11β-PGE₂

C₂₀H₃₂O₅

Molekularmasse 352,5 amu

Monoisotopische Masse 352,2 amu

[M-H] ⁻	Fragment	DP	EP	CE	CXP
351,2	→ 175,1	-65	-10	-28	-9
351,2	→ 189,1	-65	-10	-28	-17
351,2	→ 233,1	-65	-10	-18	-5
351,2	→ 235,2	-65	-10	-30	-7
351,2	→ 271,3	-65	-10	-24	-7
351,2	→ 315,2	-65	-10	-18	-9
351,2	→ 333,2	-65	-10	-18	-9

Quantifier Qualifier Verunreinigung